EXPERIENTIA

REVUE MENSUELLE DES SCIENCES PURES ET APPLIQUÉES
MONATSSCHRIFT FÜR DAS GESAMTE GEBIET DER NATURWISSENSCHAFT
RIVISTA MENSILE DI SCIENZE PURE E APPLICATE
MONTHLY JOURNAL OF PURE AND APPLIED SCIENCE

Editores: P. Huber, Basel · R. Matthey, Lausanne · A. v. Muralt, Bern · L. Ruzicka, Zürich

Redactor: H. Mislin, Basel · Mainz

BIRKHÄUSER VERLAG BASEL (SCHWEIZ)

UNIVERSITY OF HAWAII LIBRARY JUL 27 '61

SOMMAIRE – INHALT – SOMMARIO – CONTENTS

Articles généraux – Übersichtsreferate
Articoli riassuntivi – Surveys

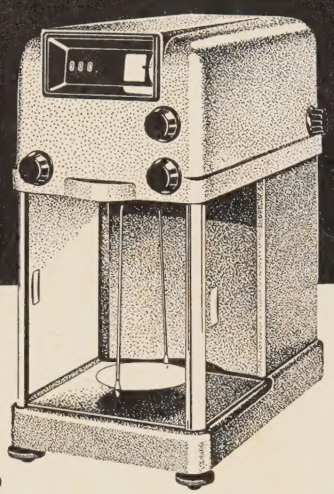
A. I. Virtanen: Über die Chemie der Brassica-Faktoren, ihre Wirkung auf die Funktion der Schilddrüse und ihr Übergehen in die Milch 241

Brèves communications – Kurze Mitteilungen
Brevi comunicazioni – Brief Reports

E. Bonatti: I sedimenti del lago di Monterosi 252
R. A. Harkness and K. Fotherby: Periodic Acid Oxidation of the Steroid 11β-Hydroxyl Group 253
A. Stolk: Two Types of Ribonucleic Protein in the Nucleolus of Intestinal Carcinoma in the Newt *Triturus alpestris* Following Injection of Herring Sperm Deoxyribonucleic Acid 254
H. Schraer and Rosemary Schraer: Bone Mass Changes in Hens Observed *in vivo* During the Egg Laying Cycle 255
B. Frydman and V. Deulofeu: (+) Lupanine in *Lupinus hilarianus* Benth. 256
P. Dukor und R. Schuppli: Konstitutionschemische Bedingungen für die Wirksamkeit von Oxytryptaminderivaten im Strahlenschutzversuch 257
M. Rechcigl, Jr., and V. E. Price: Catalase Synthesis and Destruction in Starvation 258
G. K. Russew: Über die Entstehung spezifischer bioaktiver Stoffe in der frühembryonalen Entwicklung der Tiere 260
H. M. Peters und M. Brestowsky: Artbastarde in der Gattung *Tilapia* (*Cichlidae, Teleostei*) und ihr Verhalten 261
P. O. Ganrot, A. M. Rosengren, and E. Rosengren: On the Presence of Different Histidine Decarboxylating Enzymes in Mammalian Tissues 263
V. Schreiber, A. Eckertová, Z. Franc, J. Kočí, M. Rybák, and V. Kmentová: Effect of a Fraction of Bovine Hypothalamic Extract on the Release of TSH by Rat Adenohypophyses *in vitro* 264
St. Guttmann and R. A. Boissonnas: Influence of the Structure of the *N*-terminal Extremity of α-MSH on the Melanophore Stimulating Activity of this Hormone 265
M. Goldstein and J. F. Contrera: Studies on Inhibition of 3,4-Dihydrophenylethylamine (Dopamine)β-Oxidase *in vitro* . . 267
H. I. Hadler: An Hypothesis for Oxidative Phosphorylation . 268
J. P. Guimarães and M. C. Santos Mota: Effects of Hypophysectomy and Thyroidectomy on the Glycogen Depletion in Livers of Rats Treated with Thioacetamide 270
V. K. Hopsu, S. Ruponen, and S. Talanti: Leucine Aminopeptidase in the Foetal Kidney of the Rat 271
T. F. Slater and D. Lovell: Increased Serum Diphenylamine Reaction in Patients with Leukemia 272
J. Svoboda: Immunological Tolerance to Rous Sarcoma Virus in Ducks 274
D. Kaláb: Benützung der oszillographischen Polarographie in der Mikrobiologie (Pro Experimentis) 275
S. Markees: Untersuchungen über den Fettstoffwechsel bei Ratten. (Kombinierte akute und chronische Fettüberfütterung bei normaler bzw. atherogener Grundkost) (Studiorum Progressus) 276
F. Halberg, G. Frank, R. Harner, J. Mathews, Harriet Aaker, H. Gravem, and J. Melby: The Adrenal Cycle in Men on Different Schedules of Motor and Mental Activity (Studiorum Progressus) 282

Mettler

Analysenwaagen Typ H 200 mg optische Skala



H15 Makro
H16 Halbmikro

Unser Ziel ist, laufend neue Instrumente zu entwickeln, die den steigenden Anforderungen in Forschung und Industrie jederzeit entsprechen, die einfach konzipiert und damit betriebssicher sind.
E. Mettler, Pelikanstrasse 19, Zürich

Liste des annonceurs – Verzeichnis der Inserenten – Elenco degli inserzionisti – List of advertisers – Experientia XVII/6

Bios Laboratories, Inc., New York
CIBA Aktiengesellschaft, Basel
Farmochimica Cutolo-Calosi S. p.A., Turin
Ganz Optar AG, Zürich
J. R. Geigy AG, Basel
F. Hoffmann-La Roche & Co. AG, Basel
Lonza AG, Basel
E. Mettler, Zürich
Sandoz AG, Basel
Umschau Verlag, Frankfurt am Main

L'EXPERIENTIA paraît le 15 de chaque mois. Vente et abonnement dans toutes les librairies suisses et étrangères, ou directement chez l'éditeur. Abonnement pour un an frs. 74.–. Ce prix s'entend en francs suisses.

Die EXPERIENTIA erscheint am 15. jedes Monats und kann im In- und Ausland durch jede Buchhandlung oder direkt vom Verlag bezogen werden. Der Abonnementspreis beträgt Fr. 74.–.

Insertionspreise: $^1/_1$ Seite Fr. 220.–, $^1/_2$ Seite Fr. 132.–, $^1/_4$ Seite Fr. 77.–. Inseratenannahme durch den Verlag.

EXPERIENTIA esce al 15 di ogni mese e può essere richiesta ad ogni libreria svizzera o estera, o anche direttamente alla casa editrice. L'abbonamento annuo è di fr. 74.–. Il prezzo è inteso in valuta svizzera.

EXPERIENTIA is published on the 15th of every month and can be obtained in any country through the booksellers or from the publishers. The price by annual subscription is sFr. 74.–. Price in Swiss currency.

Prices for advertising: $^1/_1$ page fr. 220.–, $^1/_2$ page fr. 132.–, $^1/_4$ page fr. 77.–. Advertisements should be sent to the publishers.

© *1961 Birkhäuser Verlag, Basel 10 (Schweiz), Telephon (061) 23 18 10; Telegrammadresse: Edita Basel*

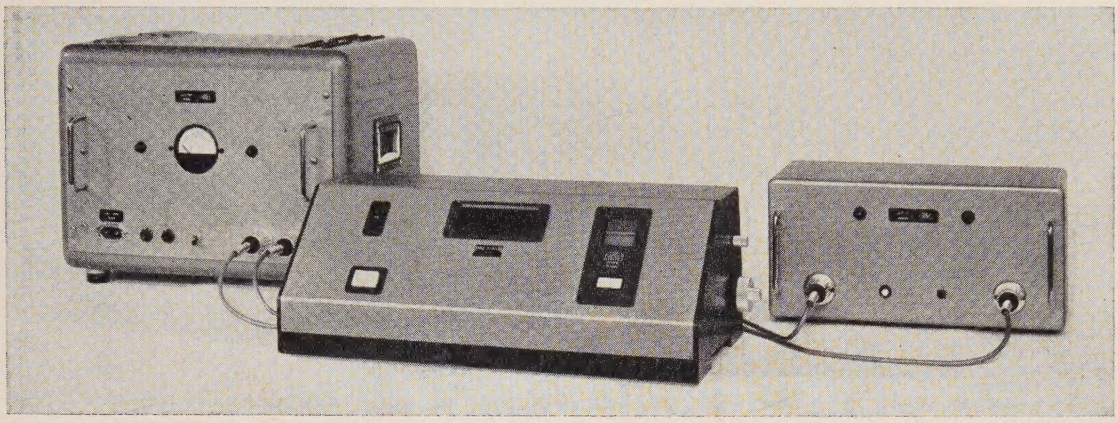
Printed in Switzerland by Birkhäuser AG., Basel

ZEISS

Lichtelektrisches Präzisionspolarimeter 0,005°

Besondere Merkmale:

- Hohe Meßgenauigkeit
- Frei von persönlichen Einstellfehlern und frei von Parallaxe
- Ermüdungsfreie Reihenmessung und denkbar einfache Bedienung
- Automatische Empfindlichkeitsregelung



Bitte verlangen Sie den Prospekt Nr. 50–381/E

Zuverlässige Beratung und Service durch eigenes Fachpersonal

CARL ZEISS

Generalvertretung für die Schweiz:

GANZ *Optar* AG
ZÜRICH
Bahnhofstr. 40 Tel. (051) 25 16 75

Lonza

Lösungsmittel
Methylacetat, Aethylacetat, Butylacetat, Lösungsmittelgemische, n-Butanol

Organische technische Produkte
Formaldehyd, Acetaldehyd, Paraldehyd, Crotonaldehyd, Essigsäure, Essigsäureanhydrid, Natriumacetat, Vinylacetat monomer, Anilinöl, Nitrobenzol, Dicyandiamid, Metaldehyd

Organische Zwischenprodukte
Acetessigäthylester, Acetessigmethylester, Phenylmethylpyrazolon, Acetessiganilid, Acetessig-o-chloranilid und andere Acetessigarylamide, Acetylaceton, Methyläthylpyridin, Nikotinsäure, Nikotinsäureamid, Acetonitril, Isobuttersäurenitril

Kunststoffe
Polyvinylchlorid in verschiedenen Qualitäten, Vinylchlorid/Vinylacetat-Mischpolymerisate, Polyvinylacetat-Dispersionen VIPOLIT® Polymethylmethacrylat in Platten VOS®

Stickstoffprodukte
Ammoniak, Salpetersäure, Ammonnitrat, Natriumnitrat, Natriumnitrit, Ammonsulfat, Harnstoff

Stickstoff- und kombinierte Dünger
Kalksalpeter, Ammonsalpeter, Kalkstickstoff, Ammonsulfat, Nitrophosphat, Nitrophosphatkali, Nitrophosphatkali borhaltig, Volldünger Lonza®, Rebendünger Lonza®, Tabakdünger Lonza®, Lonzin® für Topfpflanzen, Composto Lonza®

Calciumcarbid

Ferro-Legierungen
Ferrosilicium, Ferrosilicium-Aluminium (Alsimin®, Feralsit®), Ferrosilicium-Mangan-Aluminium (Simanal®)

Siliciummetall (Reinsilicium)

Siliciumcarbid für schleif- und feuerfeste Zwecke sowie Lonsicar® als Betonhartstoff

Graphit min. 99,9 % C

LONZA ELEKTRIZITÄTSWERKE + CHEMISCHE FABRIKEN
AKTIENGESELLSCHAFT BASEL

*

Neuerscheinung

Statistische Methoden

für Naturwissenschafter, Mediziner und Ingenieure

von

ARTHUR LINDER

Professor an der Universität Genf und an der Eidgenössischen Technischen Hochschule Zürich

Dritte, umgearbeitete und stark erweiterte Auflage

(1960) 484 Seiten mit 58 Figuren und 73 Beispielen. In Ganzleinen Fr./DM 54.–
Mathematische Reihe, Band 3, Sammlung «Lehrbücher und Monographien aus dem Gebiete der exakten Wissenschaften»

Angesichts der unvermindert anhaltenden Nachfrage hat sich der Verfasser entschlossen, seine bekannte Einführung in die neueren Methoden der mathematischen Statistik stark zu erweitern. Gleichzeitig wurde der den Anwendungen gewidmete Teil des Buches völlig umgestaltet.

Neu aufgenommen wurden unter anderem: Verschiedene Anwendungen von Chiquadrat, die Streuungszerlegung bei ungleichen Klassenhäufigkeiten, die Bestimmung der Streuungskomponente, die nichtlineare Regression, die «analysis of covariance», das Schätzen von Parametern und einige Transformationen von Prozentzahlen (Arc sin, Probit, Logit, Loglog).

1959 erschien vom gleichen Autor:

Planen und Auswerten von Versuchen

Eine Einführung für Naturwissenschafter, Mediziner und Ingenieure

2. Auflage, 182 Seiten mit 9 Fig., Ganzleinen Fr./DM 21.– (1959)

Reihe der experimentellen Biologie, Band 13, Sammlung «Lehrbücher und Monographien aus dem Gebiete der exakten Wissenschaften»

Diese Einführung richtet sich an Naturwissenschafter, Mediziner und Ingenieure; sie setzt keine Kenntnis in mathematischer Statistik voraus. Der Leser wird angeleitet, Versuche richtig zu planen und einwandfrei auszuwerten. Die gründlich durchgearbeiteten Anwendungsbeispiele aus der biologischen, medizinischen, industriellen und landwirtschaftlichen Forschung bilden einen wichtigen Bestandteil des Buches.

Kürzlich erschien vom gleichen Autor:

Handliche Sammlung mathematisch-statistischer Tafeln

40 Seiten, Fr./DM 4.50

Die vorliegende Sammlung statistischer Tafeln soll die umfangreicheren, bisher erschienenen nicht ersetzen: sie stellt vielmehr einen handlichen Auszug der am meisten verwendeten Tafeln dar, die dazu bestimmt sind, stets griffbereit auf dem Arbeitstisch zu liegen. Ausser den Tafeln von t, χ^2 und F enthält diese Sammlung Tafeln für die Transformationen von Prozentzahlen mittels Arcus sinus, Probits, Logits und Loglog sowie Tafeln für zufällig angeordnete Zahlen, die besonders beim Planen von Versuchen und Stichprobenerhebungen zu benützen sind.

Zu beziehen durch Ihre Buchhandlung – Obtainable from your bookseller

BIRKHÄUSER VERLAG · BASEL UND STUTTGART

Jetzt erhältlich, 90-95% rein

Coenzym A

10 mg $ 7.30	250 mg $ 146.—
52 mg $ 16.—	500 mg $ 230.—
100 mg $ 60.—	

Weitere Biochemikalien höchster Reinheit:

Ubichinon-30 (Coenzym Q_6)

6-Thioctsäure (d,l-α-Liponsäure)

6,8-Dithiol-octancarbonsäure (reduzierte d,l-α-Liponsäure)

6-Thioctsäureamid (d,l-α-Liponsäure-amid)

6,8-Dithiol-octancarbonsäureamid (reduziertes d,l-α-Liponsäure-amid)

6-Thioctsäureglycinamid, Natriumsalz

Diphosphopyridin Nucleotid (DPN)

Thiamin Monophosphat

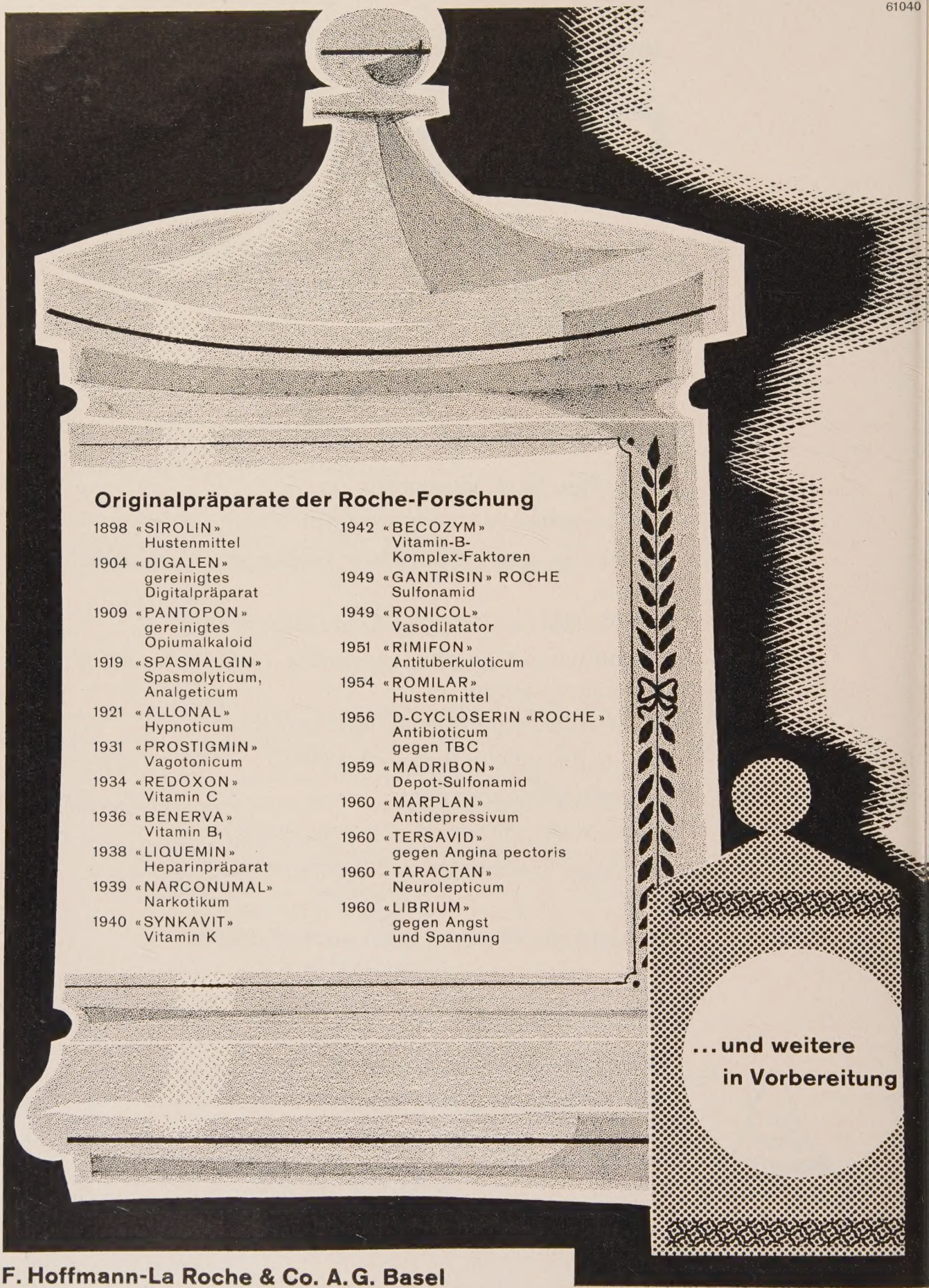
Thiamin Pyrophosphat (Cocarboxylase)

Pyridoxal-5′-phosphat (Codecarboxylase)

Industrielle Mengen sind auch lieferbar

Biochemische Abteilung
FARMOCHIMICA
CUTOLO
CALOSI S. p. A.

Postfach 332 Neapel (Italien)



Originalpräparate der Roche-Forschung

1898 «SIROLIN»
Hustenmittel

1904 «DIGALEN»
gereinigtes
Digitalpräparat

1909 «PANTOPON»
gereinigtes
Opiumalkaloid

1919 «SPASMALGIN»
Spasmolyticum,
Analgeticum

1921 «ALLONAL»
Hypnoticum

1931 «PROSTIGMIN»
Vagotonicum

1934 «REDOXON»
Vitamin C

1936 «BENERVA»
Vitamin B_1

1938 «LIQUEMIN»
Heparinpräparat

1939 «NARCONUMAL»
Narkotikum

1940 «SYNKAVIT»
Vitamin K

1942 «BECOZYM»
Vitamin-B-
Komplex-Faktoren

1949 «GANTRISIN» ROCHE
Sulfonamid

1949 «RONICOL»
Vasodilatator

1951 «RIMIFON»
Antituberkuloticum

1954 «ROMILAR»
Hustenmittel

1956 D-CYCLOSERIN «ROCHE»
Antibioticum
gegen TBC

1959 «MADRIBON»
Depot-Sulfonamid

1960 «MARPLAN»
Antidepressivum

1960 «TERSAVID»
gegen Angina pectoris

1960 «TARACTAN»
Neurolepticum

1960 «LIBRIUM»
gegen Angst
und Spannung

...und weitere in Vorbereitung

F. Hoffmann-La Roche & Co. A.G. Basel

EXPERIENTIA

Vol. XVII – Fasc. 6 Pag. 241–284 15. VI. 1961

Über die Chemie der Brassica-Faktoren, ihre Wirkung auf die Funktion der Schilddrüse und ihr Übergehen in die Milch*

A. I. VIRTANEN**

Auf Grund der Untersuchungen und der Erfahrung der jüngsten Zeit ist es offenbar geworden, dass auch kleine Störungen in der Funktion der Schilddrüse, deren Feststellung erst mit Hilfe der empfindlichen modernen Analysenmethoden möglich geworden ist, sich auf den Stoffwechsel und das Wohlbefinden des Menschen auswirken. Faktoren, welche die Funktion der Schilddrüse beeinflussen und in der Nahrung des Menschen enthalten sein können, erregen deswegen immer grössere Aufmerksamkeit.

Für diejenigen Leser, die mit der Biochemie der Schilddrüse nicht vertraut sind, möchte ich zuerst einen kurzen Überblick geben, wie und wo Hemmstoffe bei der Biosynthese von Schilddrüsenhormonen eingreifen können.

1. Der tägliche Jodbedarf des Menschen ist sehr gering. Nach der allgemeinen Auffassung sollte eine tägliche Zufuhr von mindestens 100 γ Jod schon genügen, Jodmangel vorzubeugen. Die Schilddrüse besitzt die Fähigkeit, die minimale Jodidmenge im Blut selektiv zu absorbieren und dadurch enorm anzureichern. VILKKI[1] hat neulich eine Lecithin-ähnliche Fraktion aus Schilddrüsen isoliert, welche eine ungeheure Kapazität hat, Jodid aufzunehmen. Es gibt Substanzen wie Thiocyanat (Rhodanid) und Perchlorat, welche auf Grund ihres ähnlichen Ionenradius oder aus anderen Gründen Jodidionen verdrängen und dadurch den Anreicherungsprozess stören oder hemmen können (Hemmung 1 in Fig. 1). Eine Verdrängung durch solche Fremdionen kann durch ein erhöhtes Angebot von Nahrungsjodid überwunden werden. Es ist auf Grund von Versuchen *in vitro* viel diskutiert worden, ob Thiocyanat ausser der Jodidaufnahme auch Jodierungsprozesse in der Schilddrüse *in vivo* hemmen könnte. Dafür sind jedenfalls keine Beweise vorhanden.

2. Eine Anzahl schwefelhaltige Substanzen, wie zum Beispiel Thioharnstoff und Thiouracil, verhindern die Oxydation des Jodids zum Jod (Hemmung 2 in Fig. 1), das Tyrosin jodiert. Die Biosynthese der Schilddrüsenhormone aus jodierten Tyrosinen ist eine mehrstufige Reaktion, deren Endprodukt Thyroxin ist (Hemmung 3 in Fig. 1). Nach neuesten Befunden sollte Trijodthyronin durch Dejodierung aus Thyroxin und nicht durch Kondensierung aus Mono- und Dijodtyrosin entstehen. Bei den Dejodierungsreaktionen können wahrscheinlich auch Hemmstoffe eingreifen. Die Jodierungsreaktionen und die oxydative Kondensierung der jodierten Tyrosine finden offenbar innerhalb der Proteinkette an gebundenen Tyrosinresten statt. Die Wirkung der Hemmstoffe dieser Gruppe kann durch Erhöhung des Nahrungsjodids nicht verhindert werden. Thyroxinzusatz dagegen hilft bei Schilddrüsenstörungen dieser Art[2].

3. Mehrere Beobachtungen weisen darauf hin, dass eine Anzahl aromatischer Substanzen die Jodierung von Tyrosin in der Schilddrüse unspezifisch hemmen können, indem sie selbst jodiert werden und an die Stelle von Tyrosin treten (Hemmung 4 in Fig. 1). Diese «aromatic thyroid inhibitors» wie *p*-Aminobenzoesäure, Resorcin, Phloroglucin und viele andere können die Jodierung natürlich nur in falsche Bahnen lenken, indem sie in der Schilddrüse angereichert werden.

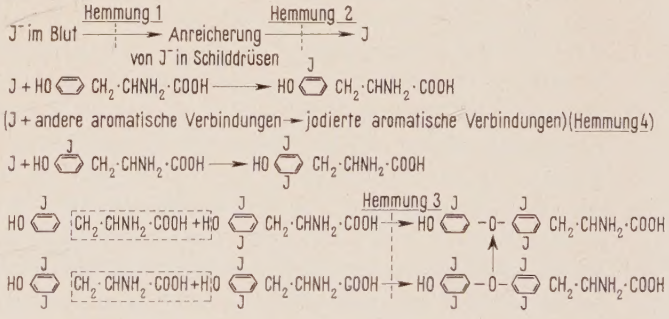


Fig. 1. Möglichkeiten zur Wirkung von Hemmstoffen auf die Biosynthese der Schilddrüsenhormone.

* Nach einem Vortrag auf der Tagung der Nobelpreisträger in Lindau 6. 7. 1960. Der Artikel ist durch neue Befunde ergänzt worden. Die experimentellen Arbeiten wurden im Rahmen eines Forschungsprojekts unter U.S. Public Law 480 durchgeführt.

** Biochemisches Forschungsinstitut, Helsinki.

[1] P. VILKKI, S. Kemistilehti B *33*, 209 (1960).

[2] s. R. PITT-RIVERS und J. R. TATA, *The Thyroid Hormones* (Pergamon Press, London 1959).

Jodidzusatz zur Nahrung kann eine Hemmung durch diese Substanzgruppe ausgleichen. Die strumigene Wirkung der Erdnuss wird auf die Jodierung von phenolischen Körpern zurückgeführt, welche aus den Glycosiden der roten Haut dieser Nüsse in der Schilddrüse entstehen[3]. Ob Hemmstoffe von dieser Art in der Nahrung wirklich von Bedeutung sind, ist noch fraglich.

Nachdem das radioaktive Jod^{131}, dessen Halbwertszeit 8 Tage beträgt, leicht erhältlich wurde, konnte dieses Isotop als Indikator zu Untersuchungen über die Störungen der Schilddrüsenfunktion allgemein in Gebrauch genommen werden. Bei den Versuchstieren kann die Schilddrüse herauspräpariert und die verschiedenen Jodverbindungen können durch geeignete Aufarbeitungsmethoden getrennt werden. Somit kann man die Verteilung des Radiojods in verschiedenen Fraktionen bestimmen und dadurch auch die Wirkung der Hemmstoffe verfolgen.

Figur 2, welche Autoradiogramme der Rattenversuche unseres Laboratoriums darstellt, zeigt die Wirkung von SCN^-, das primär die Anreicherung von Jodid in der Schilddrüse hemmt, sowie die Wirkung von Vinylthio-oxazolidon (VTO), das besonders die Synthese von Thyroxin hemmt. Sowohl SCN^- als VTO können in der menschlichen Nahrung vorkommen (siehe unten).

Bei Versuchen am Menschen können Veränderungen der Totalradioaktivität der Schilddrüse verfolgt werden. Ausserdem gibt die Bestimmung radioaktiver Jodfraktionen im Blut Aufschluss über die Funktion der Schilddrüse.

Nach diesem Überblick gehe ich zu den thyreostatisch wirkenden Substanzen in Pflanzen, insbesondere in Nahrungs- und Futterpflanzen, über.

Im Jahre 1928 beobachteten CHESNEY et al.[4], dass sich bei Kaninchen nach einseitiger Kohlfütterung grosse Kröpfe entwickelten. Diese Beobachtung konnte in einigen anderen Laboratorien bestätigt werden. MARINE et al. fanden bei Fütterung von verschiedenen Kohlsorten binnen 10–15 Tagen eine Kropfbildung[5]. Jedoch wurden auch mehrere negative Ergebnisse in der Literatur angeführt. Diese widerspruchsvollen Resultate führten zu der Annahme, dass unter verschiedenen klimatischen Bedingungen gewachsener Kohl verschiedene Wirkung besitzt. Der «Kohlkropf» konnte bei Ratten nach WEBSTER und CHESNEY[6] durch reichliche Jodzufuhr in der Nahrung verhindert werden, in den Versuchen von MCCARRISON[7] und KENNEDY und PURVES[8] gelang das jedoch nicht vollständig. In einigen Gebieten, wo die arme Bevölkerung grosse Mengen Kohl täglich isst, hat man Kropf dieses Typs auch bei Menschen festgestellt. Besonders in einigen Gegenden der Slowakei ist «Kohlkropf» eingehend studiert worden[9].

Von der chemischen Natur der kropferzeugenden Substanzen in den verschiedenen Kohlsorten hatte man noch viele Jahre nach der Beobachtung von CHESNEY keine Kenntnis. MARINE et al.[10] machten zwar 1932 die Schlussfolgerung, dass der aktive Faktor ein organisches Cyanid war, und konnten mit Acetonitril bei Kaninchen einen Kropf erzeugen, mit Thiocyanationen dagegen gelang ihnen dies nicht. 1936 stellte jedoch BARKER[11] überraschend die Entwicklung eines Kropfes bei zwei Patienten fest, die wegen hohen Blutdruckes mit Kaliumthiocyanat (KSCN) behandelt worden waren.

Die späteren, oft widerspruchsvollen Beobachtungen über die strumigene Wirkung von SCN^- fanden ihre Erklärung durch den Befund von ASTWOOD[12], dass diese Wirkung nur dann eintritt, wenn der Jodgehalt der Nahrung niedrig ist. Die Hemmung der J^--Anreicherung in der Schilddrüse durch SCN^- wurde bald danach bewiesen[13].

Die Auffassung, dass SCN^- hauptsächlich im Organismus aus organischen Nitrilen und cyanogenen Glycosiden entsteht, welche in Pflanzen vorkommen, war bis zu den letzten Jahren allgemein verbreitet. Die

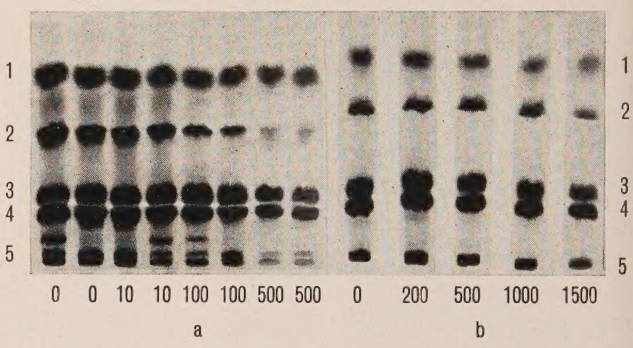


Fig. 2. Radioautogramme der Jodfraktionen von Ratten-Schilddrüsen. Die Nummern auf beiden Seiten des Bildes bedeuten: 1 Jodid, 2 Thyroxin, 3 Monojodtyrosin, 4 Dijodtyrosin, 5 Startlinie, langsam wandernde Jodverbindungen. Zur Bereitung der Papierchromatogramme wurde Kollidin-Wasser (NH_3) als Lösungsmittel gebraucht. a) Wirkung von Vinylthio-oxazolidon (VTO). Die Zahlen unter dem Bild geben die den Ratten injizierten VTO-Mengen an, γ/Tier. b) Wirkung von SCN^-. Die Zahlen unter dem Bild geben die den Ratten injizierten Thiocyanat-Mengen an, γ/Tier.

[3] V. SRINIVAN, N. R. MOUGDAL und P. S. SARMA, J. Nutrition *61*, 87 (1957).
[4] A. M. CHESNEY, T. A. CLAWSON und B. WEBSTER, John Hopk. Hosp. Bull. *43*, 261 (1928).
[5] E. B. ASTWOOD, Ann. Int. Med. *30*, 1087 (1949).
[6] B. WEBSTER und A. M. CHESNEY, John Hopk. Hosp. Bull. *43*, 291 (1928).
[7] R. MCCARRISON, Indian J. med. Res. *18*, 1311 (1931).
[8] T. H. KENNEDY und H. D. PURVES, Brit. J. exp. Path. *22*, 241 (1941).
[9] P. LANGER, J. SEDLÁK, N. MICHAJLOVSKY, R. STUKOWSKY und J. PODOBA, Arch. Sci. med. *105*, N 3 (1958).
[10] D. MARINE, E. J. BAUMANN, A. W. SPENCE und A. CIPRA, Proc. Soc. exp. Biol. Med. *29*, 772 (1932).
[11] M. H. BARKER, J. Amer. Med. Assoc. *106*, 762 (1936).
[12] E. B. ASTWOOD, J. Pharmacol. *78*, 79 (1943).
[13] J. E. VANDERLAAN und W. P. VANDERLAAN, Endocrinology *40*, 403 (1947).

Entgiftung von Cyanid im Organismus in Gegenwart von verschiedenen Schwefelverbindungen führt bekanntlich zu erhöhter SCN^--Bildung (Fig. 3). Astwood[14] vermutete, dass die erhöhte Einnahme von Nahrungsmitteln, welche eine Steigerung der SCN^--Bildung im Organismus hervorrufen, ein Joddefizit mit Kropfbildung bewirken könnte. Šilink und Maršikowá[15] fanden bei Bewohnern von Kropfgebieten in der Slowakei einen erhöhten SCN^--Spiegel im Serum und erklärten diesen Befund durch erhöhten Verbrauch der in den Nahrungsmitteln enthaltenen Substanzen, aus welchen im Organismus SCN^- entstehen kann. Jirousek[16] hat besonders die Bedeutung des endogenen Stoffwechsels von SCN^- betont. Der SCN^--Gehalt von Nahrungsmitteln war nach seiner Meinung so gering, dass er von keiner praktischen Bedeutung bei der Kropfbildung sein konnte. Jirousek[16] fand auch, dass aus Senfölen (Isothiocyansäureester) im Organismus kein SCN^- gebildet wird[17]. Er beobachtete später, dass im Kohl Schwefelverbindungen vorkommen, welche er polarographisch und papierchromatographisch als organische Polysulfide und Trithione charakterisierte[18]. Er glaubte, dass sie mit dem Brassica-Faktor identisch sind. Diese nicht genügend charakterisierten Substanzen könnten jedoch Spaltungsprodukte schwefelhaltiger Substanzen im Kohl sein.

Einen beachtenswerten Fortschritt für das «Kohlkropf»-Problem bedeutete die vor ein paar Jahren publizierte Arbeit von Langer und Michajlovskij[19], wonach viele *Brassica*-Pflanzen bedeutende Mengen präformiertes SCN^- enthalten und dieses die Quelle des SCN^--Gehalts im Organismus darstellt.

Gmelin und ich[20] haben später nachgewiesen, dass Kohl zwar kein SCN^- enthält, hingegen eine Vorstufe, aus welcher durch das Ferment «Myrosinase» SCN^- entsteht, sobald Kohl zerkleinert oder gepresst wird.

Diese Vorstufe wurde aus *Brassica oleracea sabauda* und *gongyloides* als Tetramethylammonium-Salz kristallin erhalten[21] und nach seiner Stammpflanze Glucobrassicin benannt. Durch Myrosinase wurde aus dem Glucosid bei pH 7 SCN^- quantitativ gespalten. Gleichzeitig entsteht neben Glucose und SO_4^{2-} Formaldehyd und 3,3'-Diindolylmethan (V), wahrscheinlich über 3-Hydroxymethylindol (IV). In Gegenwart von Ascorbinsäure wird 3-Hydroxymethylindol unter Bildung von Ascorbigen mit Ascorbinsäure vereinigt. Bei saurer Reaktion entsteht aus Glucobrassicin auch das Wachstumshormon 3-Indolylacetonitril. Auf Grund der Spaltprodukte konnten Gmelin und ich[22] für Glucobrassicin folgende Formel (I) feststellen.

Glucobrassicin ist das erste Senfölglucosid mit der Indolgruppe im Molekül und kann die Vorstufe von mehreren biologisch wichtigen Substanzen sein, wie aus dem Schema in Figur 3 hervorgeht. Es ist noch nicht bewiesen, dass die enzymatischen Abspaltungsreaktionen des Glucobrassicins wirklich in der intakten Pflanze stattfinden, weil die Myrosinasewirkung erst beim Zerquetschen von Pflanzengewebe festzustellen ist.

[14] E. B. Astwood, Ann. N.Y. Acad. Sci. *50*, 419 (1949).
[15] K. Šilink und L. Maršikowá, Nature *167*, 528 (1951).
[16] L. Jirousek, Physiologia Bohemoslovenica *5*, 316 (1956).
[17] L. Jirousek, Naturwiss. *42*, 536 (1955).
[18] L. Jirousek, Naturwiss. *43*, 328 (1956); *45*, 211 (1958). – L. Jirousek und L. Stárka, Naturwiss. *45*, 386 (1958).
[19] N. Michajlovskij und P. Langer, Z. physiol. Chem. *312*, 26 (1958). – P. Langer und N. Michajlovskij, Z. physiol. Chem. *312*, 31 (1958).
[20] R. Gmelin und A. I. Virtanen, Acta chem. scand. *14*, 507 (1960).
[21] R. Gmelin, M. Saarivirta und A. I. Virtanen, S. Kemistilehti *B 33*, 172 (1960).
[22] R. Gmelin und A. I. Virtanen, S. Kemistilehti B *33*, 15 (1961).

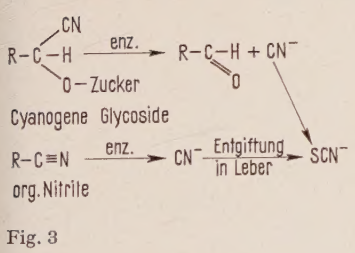


Fig. 3

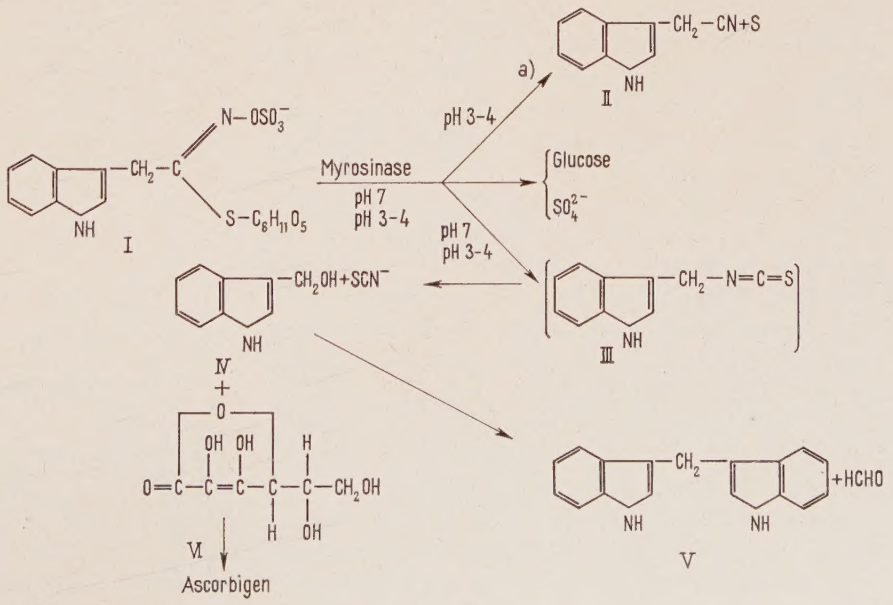


Fig. 4. Die quantitativ wichtigsten Spaltprodukte des Glucobrassicins.

Beim Verzehren von Kohl entsteht neben SCN^- auch Ascorbigen, da Kohl stets Ascorbinsäure enthält. Auf Grund der Struktur des Glucobrassicins ist die von PROCHÁZKA und ŠANDA[23] vorgeschlagene Formel für Ascorbigen nicht mehr wahrscheinlich. Nach unseren Arbeiten kann man wie schon oben gesagt annehmen, dass Ascorbigen aus 3-Hydroxymethylindol und Ascorbinsäure durch Wasserabspaltung entsteht. Wenn 3-Hydroxymethylindol und Ascorbinsäure oder Indol, Formaldehyd und Ascorbinsäure in Wasser erhitzt wurden, konnte man Ascorbigen synthetisieren (GMELIN und VIRTANEN). Die Struktur von Ascorbigen ist noch nicht sichergestellt.

In *Brassica*-Spezies kennt man bisher kein anderes Senfölglucosid als Glucobrassicin, aus welchem enzymatisch SCN^- abgespalten wurde*. Man kann darum Glucobrassicin in diesen Pflanzen quantitativ durch Bestimmung von SCN^- feststellen, das bei pH 7 durch Myrosinase in Methanolextrakt der nicht zerquetschten Pflanzenteile schnell entsteht[24]. Tabelle I enthält einige SCN^--Bestimmungen von verschiedenen *Brassica*-Spezies[16].

In Wirsingkohl (*B. oleracea* var. *sabauda*) wird am meisten SCN^- gebildet. Dies stimmt überein mit den analytischen Befunden von MICHAJLOVSKIJ und LANGER[25], die SCN^- in verschiedenen Kohlarten und in Kohlrabi in zwei Jahreszeiten und in verschiedenen Gegenden der Slowakei bestimmt haben.

Die in Wirsingkohl im Herbst enzymatisch gebildete SCN^--Menge ist so gross, dass der Mensch in einem Kilo frischen Kohls etwa 300 mg SCN^- einnehmen kann. Diese Kohlmenge enthält nur ca. 80 g Trockensubstanz und entspricht knapp 250 Kalorien. Wenn der Mensch einen wesentlichen Teil seines Energiebedarfs mit Kohl decken wollte, müsste er täglich mehrere Kilo davon essen. In einer solchen Situation ist es schon offenbar, dass die dabei zugeführte SCN^--Menge zur Kropfbildung führt, wenn die Nahrung nicht ausserordentlich viel Jod zur Beseitigung der Thiocyanatwirkung enthält. Schon 300 mg SCN^- pro Tag regelmässig eingenommen genügen wahrscheinlich zur Kropfbildung, wenn die täglich eingenommene Jodmenge nicht die in vielen Gegenden übliche Menge (unter 100 γ) überschreitet.

Die Abhängigkeit der durch SCN^- veranlassten Kropfbildung vom Jodgehalt der Nahrung geht aus folgenden in unserem Laboratorium mit Ratten ausgeführten Fütterungsversuchen hervor (Tab. II).

Auf Grund dieser Resultate ist es möglich, dass schon relativ bescheidene Thiocyanatmengen in der Nahrung des Menschen strumigen wirken können, wenn die täglich eingenommene Jodmenge nahe der Mangelgrenze liegt; handelt es sich doch stets um Jodmangel, wenn Thiocyanat zur Kropfbildung führt.

GMELIN und ich[26] beobachteten vor ein paar Jahren, dass in einigen *Cruciferae*-Pflanzen aus Senfölglucosiden neben oder statt Isothiocyansäureestern, also Senfölen, entsprechende Thiocyansäureester enzymatisch entstehen. Es handelt sich hier um einen neuen Typ von Naturstoffen. Die Umlagerungsreaktionen verlaufen dabei nach folgendem Schema (Fig. 5).

Als Beispiel sei erwähnt, dass in den zerkleinerten Samen und Frischpflanzen von *Lepidium ruderale* und *sativum* Benzylthiocyanat neben Benzylisothiocyanat (Fig. 5) entsteht. Benzylthiocyanat wurde kristallin isoliert.

Organische Thiocyanate unterscheiden sich hinsichtlich ihrer chemischen Eigenschaften und physiologischen Wirkungen wesentlich von Senfölen. Wird einer Ratte Benzylthiocyanat injiziert, so steigt der SCN^--Gehalt im Blut. Die schilddrüsenhemmende Wirkung von Benzylthiocyanat scheint nach den bisherigen Arbeiten in diesem Laboratorium der abgespaltenen SCN^--Menge zu entsprechen.

Die eigentliche Ursache dafür, dass der enzymatische Abbau der Senfölglucoside auf zwei verschiedene Arten stattfinden kann, ist noch ungeklärt. Neulich haben GAINES und GOEHRING[27] experimentell Beweise erbracht, dass «Myrosinase» in Wirklichkeit aus zwei Enzymen besteht, von denen das eine Glucose, das andere Schwefelsäure abspaltet. Wenn dies zutrifft, könnte es möglich sein, dass die relative Aktivität dieser Enzyme in verschiedenen Pflanzen ungleich ist und dass die Richtung des Abbaus davon abhängt.

Von anderen im Organismus SCN^--bildenden Pflanzenstoffen sind cyanogene Glycoside schon oben erwähnt worden. FLUX et al.[28] haben experimentell bewiesen, dass cyanogene Glycoside, Lotaustralin und Linamarin in wilden Weisskleesorten den SCN^--Gehalt

Tab. I. Bildung von SCN^- durch Myrosinase in *Brassica*-Spezies[20]

Brassica-Spezies	SCN^- gebildet mg/100 g frische Pflanze
B. oleracea var. *sabauda*[a]	27–31
B. oleracea var. *gemmifera*[a]	10
B. oleracea var. *capitata*[a]	4
B. oleracea var. *cretica*[a]	4
B. napus var. *rapifera*[b]	8,8
B. napus (Sommer Raps)[a]	2,5
B. rapa (Winter Rybsen)[a]	1,7

[a] Blätter [b] Wurzel

[23] Ž. PROCHÁZKA und V. ŠANDA, Coll. Czech. Chem. Commun. *25*, 270 (1960).

* *Zusatz während der Drucklegung:* Eben wurde in der Kohlrübe und in einigen Kohlsorten neben Glucobrassicin ein *N*-substituiertes Glucobrassicin gefunden. Aus diesem Thioglucosid, das rein dargestellt wurde, wird auch SCN^- enzymatisch abgespalten. In diesen Fällen werden beide Thioglucoside zusammen bestimmt (GMELIN und VIRTANEN).

[24] R. GMELIN und A. I. VIRTANEN, Acta chem. scand. *14*, 507 (1960).

[25] N. MICHAJLOVSKIJ und P. LANGER, Z. physiol. Chem. *317*, 30 (1959).

[26] R. GMELIN und A. I. VIRTANEN, Acta chem. scand. *13*, 1474 (1959).

[27] R. D. GAINES und K. J. GOERING, Res. Commun. *2*, 207 (1960).

[28] D. S. FLUX, G. W. BUTLER, J. M. JOHNSON, A. C. GLENDAY und G. B. PETERSEN, New Zealand J. Sci. Technol. A *38*, 88 (1956).

des Serums und des Urins bei Versuchstieren erhöhen. Die kropfbildende Wirkung von Weissklee, Erdnuss und Soja wird durch erhöhte Jodeinnahme ganz oder zum grossen Teil beseitigt. Die Auffassung von SHRINIVASAN et al.[3] von der chemischen Natur der strumigenen Faktoren der Erdnuss wurde schon oben erwähnt; die entsprechenden Faktoren in Soja[29] sind unbekannt.

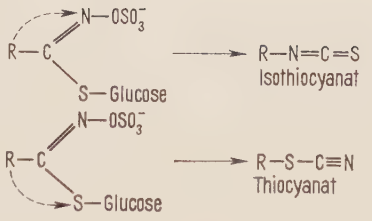


Fig. 5

Von den in Pflanzen entstehenden thyreostatisch wirkenden Substanzen, welche die Oxydation von Jodid zu Jod und die Hormonsynthese hemmen, sind die Thiooxazolidone gut charakterisiert. HERCUS und PURVES[30] machten 1936 die wichtige Beobachtung, dass sich bei den Ratten regelmässig ein Kropf entwickelt, wenn sie mit den Samen einiger Brassica-Pflanzen gefüttert wurden. Diese Beobachtung hat man ohne Ausnahme überall bestätigen können. Es zeigte sich, dass der «Brassicasamen-Kropf» nicht mit Jodid, sondern nur mit Thyroxin zu bekämpfen ist und sich dadurch von dem «Kohl-Kropf» unterscheidet.

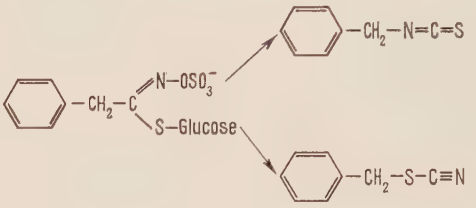


Fig. 6

KENNEDY[31] nahm 1942 an, dass Allylthioharnstoff die natürliche goitrogene Substanz sein könnte. Bald danach folgten Arbeiten von mehreren Autoren[32,33], welche zeigten, dass einige Thioharnstoffe und Sulfonamide die Biosynthese von Thyroxin hemmen und dadurch strumigen wirken. In der Literatur findet man

[29] A. W. HALVERSON, M. ZEPPLIN und E. B. HART, J. Nutrition *38*, 115 (1949).
[30] C. E. HERCUS und H. D. PURVES, J. Hyg. Camb. *36*, 182 (1936).
[31] T. H. KENNEDY, Nature *150*, 233 (1942).
[32] C. G. MACKENZIE und J. B. MACKENZIE, Endocrinology *32*, 185 (1943).
[33] E. B. ASTWOOD, J. SULLIVAN, A. BISSEL und R. TYSLOWITZ, Endocrinology *32*, 210 (1943).

Tab. II. Die Abhängigkeit der strumigenen Wirkung von SCN^- vom Jodgehalt der Nahrung. Rattenversuch Nr. 45. 23. 8.–14. 11. 1960. 6 Gruppen à 10 Ratten, 3 Gruppen (A) 2 γ Jod/Tier/Tag, 3 Gruppen (B) 16 γ Jod/Tier/Tag. Grundnahrung in allen Gruppen gleich. Gewichtszunahme der Ratten in verschiedenen Gruppen, g/Tier.

Tag	Gruppe A			Gruppe B		
	Kontrollen	0,64 mg SCN^-/Tag	5,8 mg SCN^-/Tag	Kontrollen	0,70 mg SCN^-/Tag	7,5 mg SCN^-/Tag
24. 8.	67,4	67,7	67,1	66,0	67,9	67,5
31. 8.	78,7	80,3	77,2	74,0	79,0	81,1
7. 9.	91,3	91,0	82,3	83,6	90,3	87,6
14. 9.	103,9	103,8	95,7	98,6	103,1	102,3
21. 9.	109,2	107,8	102,5	104,7	108,6	107,5
28. 9.	114,4	110,2	108,6	110,1	113,0	113,6
5. 10.	118,5	113,8	112,1	113,3	116,2	115,1
12. 10.	117,5	114,3	115,3	111,4	117,3	115,0
19. 10.	125,3	123,0	121,8	121,1	124,1	124,3
26. 10.	128,9	127,0	124,0	123,4	128,0	128,0
2. 11.	131,8	129,6	126,6	125,6	130,7	131,7
9. 11.	136,3	133,6	129,1	129,7	134,5	135,0
Gewicht der Schilddrüse						
mg/Tier	15,8	19,7	27,1	8,6	9,8	10,7
Jod in Schilddrüse und Blutserum						
γ J/mg Schilddrüse	0,060	0,041	0,022	1,16	1,06	0,58
γ J/100 ml Blut	1,7	1,1	1,2	6,8	6,0	7,5
γ SPJ/100 ml Blut	1,7	1,2	1,2	3,2	3,5	3,8
Histologische Auswertung der Schilddrüsenpräparate						
Kolloid	5,9%	5,8%	0,9%	30,8%	22,7%	22,8%
Epithel	79,4%	85,4%	88,8%	47,8%	59,8%	61,4%
Stroma	14,7%	8,8%	10,3%	21,4%	17,5%	15,8%
SH-Verbindungen in der Leber als Glutathion mg/g Leber. Polarographische und ampèrometrische Bestimmungen						
polarographisch	2,35	2,56	2,63	2,46	2,37	2,60
ampèrometrisch	3,33	3,30	3,67	2,83	2,80	3,81

nach der Veröffentlichung der Mitteilung von KENNEDY[31] einige Angaben über das Vorkommen von Thioharnstoffderivaten in Pflanzen. Es ist aber sehr wohl möglich, dass die gefundenen Thioharnstoffe Kunstprodukte sind. Die Senföle reagieren nämlich leicht mit Ammoniak bzw. Aminen nach der Gleichung: $R-N=C=S + NH_3(RNH_2) \rightarrow R-NH-C(=S)-NH_2$.

Im Jahr 1949 gelang es ASTWOOD, GREER und ETTLINGER[34], das Goitrin, *L*-5-Vinyl-2-Thiooxazolidon (VTO) aus den zerkleinerten Kohlrüben und den mit Wasser behandelten zerkleinerten Brassicasamen zu isolieren. Der thyreostatische Effekt dieser Substanz war beim Menschen ebenso gross wie der von Propylthiouracil, das zu den stärksten Hemmstoffen der Schilddrüsenfunktion gezählt wurde. Andere, in bestimmten *Cruciferae*-Samen enzymatisch entstehende Thiooxazolidonderivate sind Dimethylthio-oxazolidon, isoliert von HOPKINS[35] aus *Conringia orientalis*, und Phenylthio-oxazolidon, isoliert von KJAER und GMELIN[36] aus *Barbarea vulgaris*. Die entsprechenden Thioglucoside sind auch isoliert worden. Bis vor kurzem war man allgemein der Auffassung[5], dass das Thioglucosid, Progoitrin, ohne die pflanzliche Thioglycosidase («Myrosinase») nicht im tierischen Organismus hydrolysiert wird. GREER et al.[37] haben jedoch gefunden, dass Progoitrin ohne «Myrosinase» sowohl im Ratten- als auch im menschlichen Organismus zu VTO verwandelt wird.

Nachdem ETTLINGER und LUNDEEN[38] nachgewiesen hatten, dass die Senfölglucoside Hydroxylaminderivate sind, wurde die frühere Strukturformel dieser Glucoside von diesen Forschern wesentlich korrigiert und ihre neue Formel durch Synthese bestätigt. Die Entstehung von Thiooxazolidon aus den in Pflanzen vorkommenden Senfölglucosiden, welche am Kohlenstoffatom 2 die Hydroxylgruppe enthalten müssen, erfolgt nach der neuen Glucosidformel folgendermassen (Fig. 7) (GREER[39], KJAER et al.[40], SCHULTZ und WAGNER[41]).

Das reichliche Vorkommen von VTO in vielen Brassicasamen gab eine Erklärung für das Zustandekommen des «Brassicasamen-Kropfes». ASTWOOD et al. konnten damals mit der von ihnen verwendeten Analysenmethode die Entstehung von VTO, auch Goitrin genannt, in Brassica-Frischpflanzen nicht nachweisen. In unserem Laboratorium wurde jedoch vor ein paar Jahren VTO auch in zerquetschtem Kohl gefunden[42], nachdem KREULA und KIESVAARA[43] eine empfindliche Analysenmethode entwickelt hatten. Unabhängig von den Befunden in diesem Laboratorium haben ALTAMURA et al.[44] etwas später über das Vorkommen von Progoitrin in winzigen Mengen in Kohl berichtet. Sie haben VTO massenspektrographisch bestimmt.

In Tabelle III sind einige VTO-Bestimmungen von verschiedenen Kohlsorten und Kohlrüben im Herbst und nach etwa 6monatiger Lagerung angeführt.

Nach diesen Resultaten hätte die untersuchte Weisskohlsorte im Herbst nur etwas weniger VTO enthalten als die Kohlrübe. Das ist nicht in Übereinstimmung mit den Beobachtungen, dass Kohlrübe antithyroidale Wirkung hervorruft, welche nur teilweise durch Jodzugabe zu verhindern ist[5], wogegen der «Kohlkropf» sich nicht entwickelt, wenn die Nahrung genügend Jod enthält. Der gefundene VTO-Gehalt des Preßsaftes sowohl von Kohl als von Kohlrübe war jedoch so niedrig, dass die antithyreoidale Wirkung von VTO nur bei übermässigem Verbrauch dieser Vegetabilien in Frage kommen kann. Ohne grösseres Analysenmaterial von verschiedenen Kohl- und Kohlrübensorten bleibt unklar, welche Bedeutung diesen allgemein gebrauchten Vegetabilien als VTO-Quelle zukommt.

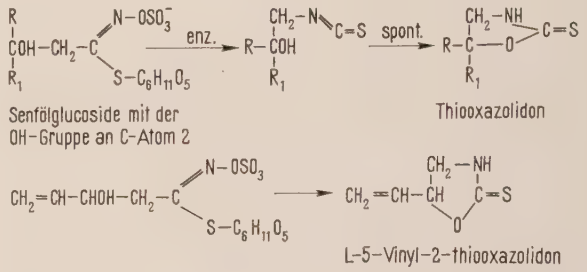


Fig. 7

Tab. III. VTO-Gehalt des Preßsaftes einiger Kohlsorten und der Kohlrübe (nach Bestimmungen von KREULA und KIESVAARA[43]).

Datum	VTO γ/ml	Trockensubstanz des Kohls %	Kohlsorte
9. 9. 1958	24	8,3	Weisskohl
17. 3. 1959	1	8,2	Weisskohl
17. 3. 1959	60	—	Weisskohl, die jüngsten Herzblätter
11. 9. 1958	18	9,7	Rotkohl
3. 4. 1959	5	8,3	Rotkohl
15. 9. 1958	28	—	Kohlrübe
15. 10. 1958	25	—	Kohlrübe
30. 3. 1959	0	—	Kohlrübe
15. 1. 1961	22	—	Kohlrübe

[34] E. B. ASTWOOD, M. A. GREER und M. G. ETTLINGER, J. biol. Chem. *181*, 121 (1949).
[35] C. Y. HOPKINS, Can. J. Reb. 16 B, 341 (1938).
[36] A. KJAER und R. GMELIN, Acta chem. scand. *11*, 906 (1957).
[37] M. A. GREER, S. IINO und S. BARR, Fourth International Goitre Conference, Abstracts, Excerpta Medica Foundation (1960).
[38] M. G. ETTLINGER und A. J. LUNDEEN, J. Amer. chem. Soc. *78*, 4172 (1956).
[39] M. A. GREER, J. Amer. chem. Soc. *78*, 1260 (1956).
[40] A. KJAER, R. GMELIN und R. BOE JENSEN, Acta chem. scand. *10*, 432 (1956).
[41] O. E. SCHULZ und W. WAGNER, Arch. Pharm. *289/61*, 597 (1956).
[42] A. I. VIRTANEN, M. KREULA und M. KIESVAARA, Acta chem. scand. *12*, 580 (1958).
[43] M. KREULA und M. KIESVAARA, Acta chem. scand. *13*, 1375 (1959).
[44] M. R. ALTAMURA, L. LONG Jr. und T. HASSELSTRÖM, J. biol. Chem. *234*, 1847 (1959).

In Tabelle IV sind einige VTO-Bestimmungen von Samen und in Tabelle V von grünen Teilen verschiedener *Cruciferae*-Pflanzen angeführt (KREULA und KIESVAARA[43]). Aus den Analysenwerten geht hervor, dass in einigen als Grünfutter verwendeten Rapsarten und Kohlrübenblättern nicht unbedeutende Mengen Progoitrin vorkommen. Wenn man den hohen Wassergehalt dieser Futterpflanzen und die grossen täglichen Rationen, welche die Kühe fressen, berücksichtigt, kann die eingenommene Menge von Progoitrin bei einseitiger Fütterung beachtenswert sein. Im Markstammkohl ist die Bildung von Vinylthiooxazolidon dagegen sehr gering. Auf Grund des Progoitringehalts des Futters kann jedoch nicht die wirklich in den Organismus der Kuh übergegangene VTO-Menge geschätzt werden, da dem Panseninhalt zugesetztes VTO in *in vitro*-Versuchen schon nach einigen Stunden verschwand. Man kann darum annehmen, dass das beim Kauen und im Pansen durch das pflanzliche «Myrosinase» gebildete VTO nur zum Teil aus dem Pansen ins Blut übergeht.

Der Mensch isst zwar kein Grünfutter, aber er trinkt Milch, welche von Kühen stammen kann, die mit *Brassica*-Pflanzen gefüttert wurden oder auf der Weide als Unkraut wachsende *Cruciferae*-Pflanzen eingenommen haben. Es erhebt sich darum die wichtige Frage, ob und in welchem Umfang strumigene Substanzen vom Pansen oder Darmkanal in die Milch übergehen können. Da in den vergangenen Jahren hier und dort von medizinischer Seite wiederholt behauptet wurde, dass Milch strumigene Eigenschaften besitzen kann, haben wir uns diesem Problem näher zugewandt.

Zuerst bestimmten wir qualitativ und quantitativ den Übergang von VTO und SCN^- vom Futter in die Milch. Da die enzymatische Bildung dieser Substanzen in dem Pansen der Kuh offenbar quantitativ stattfindet – bei 40°C und pH ca. 6,5 ist die Bildung von VTO im Pflanzenhomogenat schon in 2 h und von SCN^- in noch kürzerer Zeit vollständig – wäre ihr Übergang vom Pansen in das Blut und von hier aus in die Milch wenigstens einigermassen denkbar. Dieses Problem ist in unserem Laboratorium durch Fütterungsversuche mit Milchkühen untersucht worden[45] (Tabelle VI).

Beim Aufbewahren der gemolkenen Milchproben, sogar bei 0°C, verschwindet VTO oft innerhalb von einigen Stunden. Durch Zusatz von Schwefelwasserstoff wird VTO zum grossen Teil regeneriert. Wenn die Milchprobe sofort nach dem Melken bis 85°C erhitzt wird, bleibt der VTO-Gehalt unverändert, bei niedriger Temperatur sogar mehrere Tage. Bei den VTO-Bestimmungen, deren Resultate in Tabelle VI angeführt sind, wurden erhitzte Milchproben angewendet.

Aus Tabelle VI geht hervor, dass höchstens etwa 0,05% des verfütterten oder des im Futter enzymatisch gebildeten Vinylthiooxazolidons in die Milch übergeht. Der Übergang erfolgt schnell, denn schon 2 h nach der

Tab. IV. Vinylthio-oxazolidon mg/g, gefunden in zerquetschten, angefeuchteten Samen von *Cruciferae*-Pflanzen[43]

Spezies	Proben	VTO Variationsbreite mg/g	Mittelwerte mg/g
Sommer-Raps	8	2,3 – 4,2	3,16
Winter-Raps	11	7,7 –12,3	8,96
Sommer-Rybsen	3	0,2 – 0,8	0,46
Winter-Rybsen	16	0,04– 0,7	0,27
Grossblättrige Wasserrübe	9	0,2 – 3,5	1,16
Wasserrübe	2	0,5 – 0,9	0,70
Kohlrübe	9	3,2 –14,5	6,70
Markstammkohl	1	–	1,07
Rettich	1	–	0,04

Tab. V. Vinylthio-oxazolidon, gefunden in Preßsaft von grünen Teilen (Blätter und Stämme) verschiedener *Cruciferae*-Pflanzen[43]

Spezies	Proben	VTO Variationsbreite µg/ml	Mittelwerte µg/ml
Sommer-Raps V[a]	1	–	4
Sommer-Raps K[b]	8	2–40	14
Winter-Raps V	9	7–73	33
Winter-Raps K	4	23–135	69
Sommer-Rybsen K	2	3– 60	32
Winter-Rybsen K	1	–	24
Wasserrübe K	1	–	72
Grossblättrige Wasserrübe V	4	11– 55	25
Markstammkohl V	3	0– 8	3
Markstammkohl K	1	–	9

[a] V = Feldversuch [b] K = Gewächshaus

Tab. VI. Übergang von Vinylthio-oxazolidon in Milch. Experimente mit Kühen[45]

500 mg kristallines VTO einmal in den Pansen eingeführt						
Vor VTO-Dosis	0 nach	2 h	6,5 h	10,5 h	24 h	48 h
VTO-Gehalt der Milch γ/l		190	35	17	+ ?	0
VTO, übergegangen in Milch		0,035	0,013	0,006		
% des gegeb. VTO			0,05			
100 g zerquetschte, angefeuchtete Samen von Sommer-Raps = 800 mg VTO	nach	12 h	24 h	36 h	48 h	
VTO-Gehalt der Milch, γ/l		77	26	17	0	
% des Total-VTO			0,02			
1,6 g kristallines Progoitrin = 525 mg VTO	nach	12 h				
VTO-Gehalt der Milch, γ/l		Spuren				
2 × 15 kg Markstammkohl kg/Tag = 66 mg VTO	nach	12 h				
VTO-Gehalt der Milch, γ/l		4				
% des Total-VTO		0,05				
10 kg Grünraps = 280 mg VTO	nach	12 h				
VTO-Gehalt der Milch, γ/l		20				
% des Total-VTO		0,04				

[45] A. I. VIRTANEN, M. KREULA und M. KIESVAARA, Acta chem. scand. *13*, 1043 (1959).

Fütterung von reinem VTO enthält die gemolkene Milch etwa $^2/_3$ des in die Milch sekretierten Total-VTO. Das ist ein Beweis dafür, dass die Substanz schon vom Pansen aus ins Blut übergeht. Wurde der Kuh kristallines Progoitrin, also das Thioglucosid, ohne Brassicapflanzen verfüttert, so konnten nach 12 h nur Spuren von VTO in der Milch gefunden werden. Im Pansen wird also Progoitrin ohne das pflanzliche Enzymsystem nicht nachweisbar hydrolysiert.

Nach diesen Ergebnissen kann Milch unter bestimmten Fütterungsbedingungen zwar minimale Mengen Vinylthiooxazolidon enthalten, aber die Menge ist so klein (über 0,1 mg VTO/l Milch wurden nie gefunden), dass dadurch keine Gefahr einer strumigenen Wirkung der Milch entstehen kann. In Konsummilch und in Milchproben von Molkereien haben wir in Finnland nie VTO gefunden.

Soeben haben BACHELARD und TRIKOJUS[46] gefunden, dass Cheirolin (3-Methylsulphonylpropylsenföl) strumigene Eigenschaften hat. Nach Verfütterung von 1 g Cheirolin konnten wir[47] in der Milch weder Cheirolin noch daraus gebildeten Thioharnstoff[46] $(CH_3 \cdot SO \cdot \cdot CH_2 \cdot CH_2 \cdot NH)_2C{=}S$ finden.

Wir haben sowohl durch Verfütterung von SCN^- als auch von Kohl, Markstammkohl und Kohlrüben den Übergang von SCN^- in die Milch untersucht. Die Milch finnischer Molkereien enthält während der Stallfütterung durchschnittlich nur etwa 0,2 mg% SCN^-. Im Sommer ist der Gehalt etwas höher, etwa 0,4 mg%. In den Milchproben, welche wir monatlich durch das ganze Jahr von der Schweiz erhalten haben, ist 0,4 bis 0,6% SCN^- gefunden worden, also etwas mehr als in der in Finnland produzierten Milch.

Wenn den Versuchskühen grosse Mengen von Kohlrüben oder Markstammkohl verfüttert wurden, stieg der SCN^--Gehalt der Milch auf 0,8 mg%. Wenn so grosse Mengen wie 6 g SCN^- als Kalium- und Ammoniumsalz auf einmal einer Kuh gegeben wurde, enthielt die Milch, welche 10 h nach der Fütterung gemolken wurde, 1,75 mg% SCN^- [48] (Fig. 8).

Nach diesen Resultaten scheint es praktisch nicht möglich zu sein, Kuhmilch zu produzieren, deren SCN^--Gehalt wesentlich über 1 mg% liegt. In 1 l Milch kann der Mensch folglich höchstens ungefähr 10 mg SCN^- erhalten, eine Menge, welche weder bei Erwachsenen noch bei Kindern erwiesenermassen Störungen der Schilddrüsenfunktion verursachen kann, wenn der Jodgehalt der Nahrung nicht an der Mangelgrenze liegt. Es sei in diesem Zusammenhang erwähnt, dass WRIGHT[49] 4,6 mg SCN^- in 100 ml Ziegenmilch (nicht in Kuhmilch, wie in der Literatur[2] zitiert ist) gefunden hat, wenn die Tiere mit Markstammkohl gefüttert wurden.

Es erhebt sich nun die Frage, ob die Behauptungen in der Literatur von den strumigenen Eigenschaften der Milch wirklich experimentell gestützt sind. Die spärlichen experimentellen Unterlagen, auf Grund deren man diese Behauptungen aufgestellt hatte, berechtigen nach meiner Ansicht nicht zu einer so schwerwiegenden Folgerung.

In den letzten Jahren sind mir experimentelle Arbeiten, in denen eine strumigene Wirkung der Milch behauptet wird, besonders von zwei Seiten bekannt. CLEMENTS und WISHART[50] teilten 1956 mit, dass in bestimmten Teilen Tasmaniens gehäufte Strumafälle auftraten, obwohl dort mit Jodidgaben regelmässig Kropfprophylaxe betrieben wurde. Sie nahmen an, dass die Zunahme der Kropffälle auf einen vermehrten Anbau und Verfütterung einer Markstammkohlsorte (chou moellier kale, *Brassica oleracea moelleria*) zurückzuführen sei. Sie stützten ihre Auffassung auf einige Versuche an Ratten und Menschen, wobei die Jodaufnahme der Schilddrüse unter Anwendung von J^{131} bestimmt wurde[50,51]. Bei ihren Schlussfolgerungen haben diese Forscher jedoch nicht berücksichtigt, dass schon allein die Salze, welche in ihrem Äthanolextrakt aus Milch enthalten sind, in Ratten injiziert eine Hemmung der Jodaufnahme hervorrufen können. In entsprechenden Kontrollversuchen konnten wir mit einem Äthanolextrakt aus Konsummilch bereits eine starke Hemmung der Jodaufnahme finden. Ähnliche Hemmeffekte liessen sich jedoch auch mit künstlichen Salzmischungen erzielen, welche in ihrer Zusammensetzung den Äthanolextrakten der Milch entsprachen.

Wir haben bei unseren Versuchen beobachtet, dass auch mit beliebigen Äthanolextrakten aus Pflanzen oft unspezifische Hemmungen der Jodaufnahme auftreten, und vertreten deshalb die Auffassung, dass man mit Schlussfolgerungen sehr zurückhaltend sein muss,

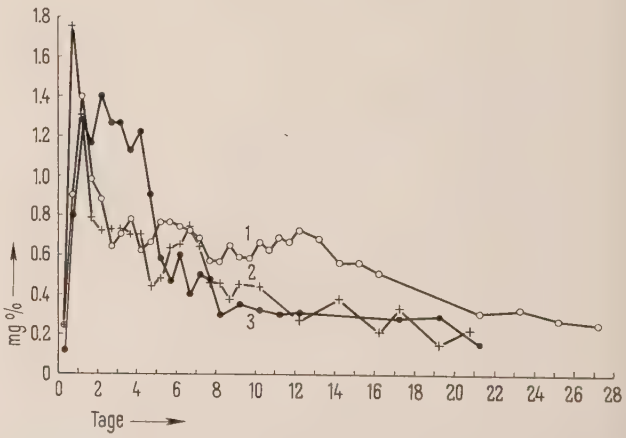


Fig. 8. SCN^--Gehalt der Milch von Kühen, denen verschiedene Dosen K- und NH_4-Thiocyanat gegeben wurden. 1. Kuh Häyri: 5,46 g SCN^- in zwei Dosen 16. 1. 1960; 2. Kuh Häyri: 6 g SCN^- auf einmal 29. 2. 1960; 3. Kuh Mila: 24 g SCN^- in acht Dosen binnen vier Tagen.

[46] M. S. BACHELARD und V. M. TRIKOJUS, Nature *185*, 80 (1960).
[47] R. GMELIN und A. I. VIRTANEN, nicht publiziert.
[48] A. I. VIRTANEN und R. GMELIN, Acta chem. scand. *14*, 941 (1960).
[49] E. WRIGHT, Nature *181*, 1602 (1958).
[50] F. W. CLEMENTS und J. W. WISHART, Metabolism *5*, 623 (1956).
[51] F. W. CLEMENTS, Brit. med. Bull. *16*, 133 (1960).

wenn die Wirkung der Extrakte unbekannter Zusammensetzung auf die Hemmung der Jodaufnahme erklärt werden soll.

In unserem Laboratorium ist die mögliche thyreostatische Wirkung der Milch sowohl in langdauernden Fütterungsversuchen mit Ratten als auch in kurzdauernden Versuchen mit Menschen geprüft worden. In den letztgenannten Versuchen kam die Standardmethode für die Bestimmung der Wirkung von antithyroidalen Substanzen auf die J^{131}-Aufnahme der Schilddrüse beim Menschen zur Anwendung (Stanley und Astwood[52], MacGregor und Miller[53]). Diese Methode haben auch Clements und Wishart gebraucht. Vilkki et al.[54] haben insgesamt 25 Versuche mit 22 Freiwilligen aus unserem Laboratorium durchgeführt. Jede Versuchsperson trank am Morgen nüchtern 1,1–2,1 l Milch kurze Zeit nach Einnahme von 1–5 μc J^{131}. Die Fütterung der Kühe, deren Milch bei den Versuchen verwendet wurde, war sehr verschieden. Grünraps (Sommer- und Wintersorten), Weisskohl, Rotkohl, Markstammkohl und grossblättrige Wasserrüben wurden in Tagesrationen von 20 bis 30 kg/Kuh, entsprechend etwa 25 bis 35% der totalen Futtermenge, gegeben. Als «Kontrollmilch» wurde Konsummilch von Helsinki und mit Heu oder mit Silage (Rotklee-Grasmischung) produzierte Milch angewendet. In keinem einzigen Fall wurde die Aufnahme von radioaktivem Jod durch die Milcheinnahme beeinflusst (Fig. 9). Zur Kontrolle, ob die gebrauchte Bestimmungsmethode zweckmässig funktionierte, wurden den Versuchspersonen etwa 3 h nach dem Milchtrinken 50–100 mg VTO oder 5 mg Neomercazol verabreicht. Wie aus den Kurven in Figur 10 hervorgeht, wurde die Aufnahme von J^{131} danach stark gehemmt.

In einem eben publizierten Artikel teilt Clements[51] mit, dass in seinen neuen Versuchen die Aufnahme von J^{131} durch die mit Markstammkohl produzierte Milch nicht regelmässig beeinflusst wurde. Greene et al.[55] haben in England versucht, die Experimente von Clements zu wiederholen. Der Einfluss der Milch auf die Aufnahme von J^{131} war in ihren Versuchen sehr klein. Auf der Weide produzierte Milch hatte etwas stärkere Wirkung als Kontrollmilch. Diese hatte wieder dieselbe Wirkung wie «chou-moellier»-Milch. Es ist doch fraglich, ob bei diesen Versuchen überhaupt eine Hemmung festzustellen war, da andere mitwirkende Faktoren, wie besonders der Jodgehalt der Milch, nicht bestimmt waren. Das war auch der Fall in den Versuchen von Clements.

Bei den Untersuchungen von Vilkki et al.[54] in diesem Laboratorium wurden Totaljod, proteingebundenes Jod im Serum (SPJ) und SCN^--Gehalt im Blut bestimmt. Die Mittelwerte dieser Bestimmungen gehen aus Tabelle VII hervor.

In Milchproben wurden VTO, SCN^- und Totaljod bestimmt. Nur in 2 Milchproben von Kühen, welche mit 30 kg Grünraps (Lembke) und mit grossblättriger

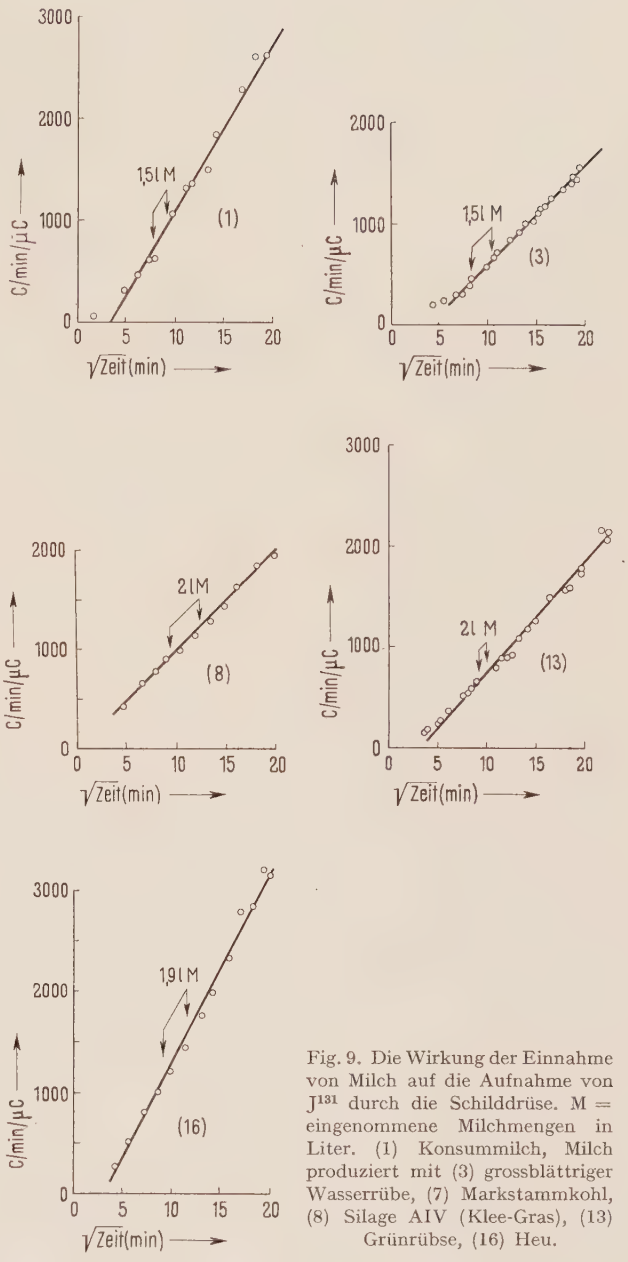


Fig. 9. Die Wirkung der Einnahme von Milch auf die Aufnahme von J^{131} durch die Schilddrüse. M = eingenommene Milchmengen in Liter. (1) Konsummilch, Milch produziert mit (3) grossblättriger Wasserrübe, (7) Markstammkohl, (8) Silage AIV (Klee-Gras), (13) Grünrübse, (16) Heu.

Tab. VII. SCN^--, SPJ- und Totaljod-Gehalt des Blutserums der Versuchspersonen, Mittelwerte. (Gruppen: Männer-Frauen, Raucher-Nichtraucher.)

	SCN^- mg/l		Totaljod γ/100 ml		SPJ γ/100 ml	
	Nicht-raucher	Raucher	Nicht-raucher	Raucher	Nicht-raucher	Raucher
Frauen	2,1	11,0	5,4	5,6	5,2	5,1
Männer	2,3	8,4	6,9	6,0	6,4	5,3

[52] M. M. Stanley und E. B. Astwood, Endocrinology *41*, 12 (1947).
[53] A. C. MacGregor und H. Miller, Lancet I *1953*, 881.
[54] P. Vilkki, M. Kreula und E. Pironen, nicht publiziert.
[55] R. Greene, H. Farran und R. F. Glascock, J. Endocrin. *17*, 272 (1958).

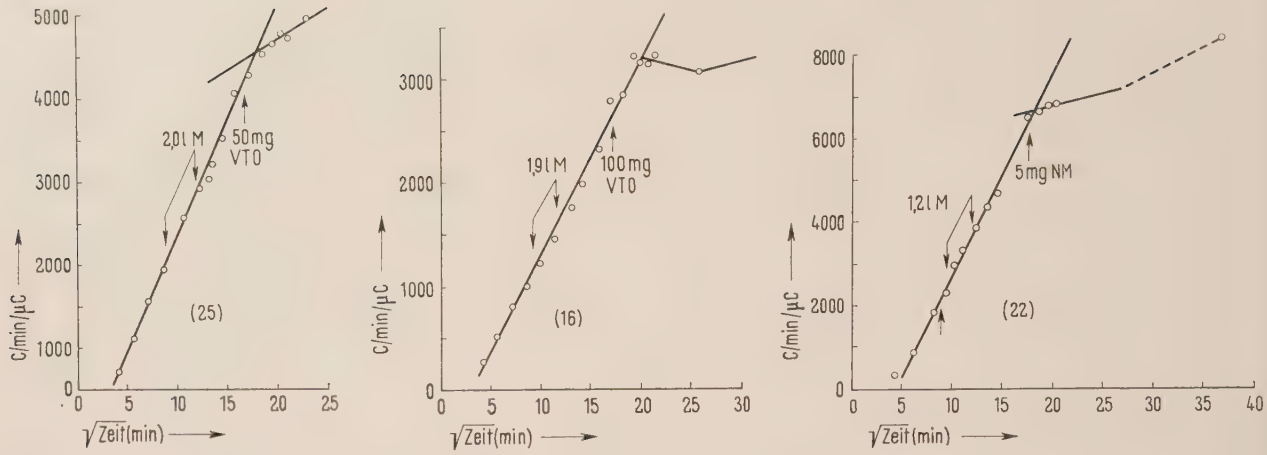


Fig. 10. Die Wirkung von VTO und Neomercazol (NM) auf die Aufnahme von J^{131} durch die Schilddrüse nach der Einnahme von Milch.

Wasserrübe gefüttert waren, wurde VTO gefunden (20,3 γ bzw. 12,6 γ/l). Der SCN^--Gehalt variierte von 0,5 mg/l (Heufütterung) bis 8,0 mg/l Milch (Grünraps- und Markstammkohlfütterung). Der Jodgehalt der Milchproben variierte von 8 bis 142 γ/l.

Da der Jodgehalt der Milch enorm variieren kann, wurde die Einwirkung von Jodzusatz auf die Aufnahme von J^{131} bei 4 Versuchspersonen besonders untersucht (VILKKI et al.[54]). Diese nahmen während einer Woche täglich eine bestimmte Jodidmenge ein (0,5, 1,0, 1,5, 2,0 mg), wonach der Versuch mit J^{131} ausgeführt wurde. An Stelle von Milch nahm jeder von den Versuchspersonen 100 + 300 + 600 γ J^- ein. Die Wirkung dieser Jodmengen auf die Aufnahme von J^{131} geht aus der Figur 11 hervor.

Die Kurven zeigen, dass 300 γ J^- schon eine kleine Hemmung bei 3 Personen und eine erhebliche Hemmung bei 1 Person verursacht haben. Die relativen Aufnahmen von J^{131} durch die Schilddrüse bei Frauen (F) und Männern (M), welche als Versuchspersonen an den Experimenten teilgenommen haben, gehen aus Figur 13 hervor.

Auf Grund dieser Experimente ist es wichtig, dass der Jodgehalt der Milchproben, welche auf ihre antithyreoidale Wirkung geprüft werden, bestimmt wird. Der Jodzustand der Versuchspersonen muss untersucht werden. Deshalb ist die Bestimmung von Totaljod und SPJ am Platze.

Langdauernde Fütterungsversuche mit Ratten, bei welchen die Wirkung verschiedener Milchproben auf die Schilddrüsenstruktur und -funktion untersucht wird, sind noch im Gange. Die bisherigen Resultate solcher Experimente haben weder statistisch gesicherte Veränderungen im Gewicht noch in der histologischen Struktur der Schilddrüse ergeben. Die Schilddrüsen von Ratten, welche neben der Grundnahrung etwa 12 ml/Ratte Konsummilch oder mit *Brassica*-Futterpflanzen produzierte Milch oder Wasser erhalten hatten, wurden hierbei verglichen.

In Finnland, das auf der Erdkugel gegenüber von Australien liegt, hat PELTOLA[56, 57] die Bedeutung der in Milch übergehenden strumigenen Substanzen für die Entstehung der endemischen Struma, die im Seengebiet des Binnenlandes sehr häufig vorkommt, betont. Auf Grund der Jodbestimmungen von Urinproben haben VIRTANEN und VIRTANEN[58] festgestellt, dass der Urin der untersuchten Personen im Strumagebiet durchschnittlich 20,7 γ/l und im nicht-Strumagebiet 25,8 γ/l enthielt. Der Unterschied ist an und für sich nicht gross; aber als die Urinproben auf Grund ihres

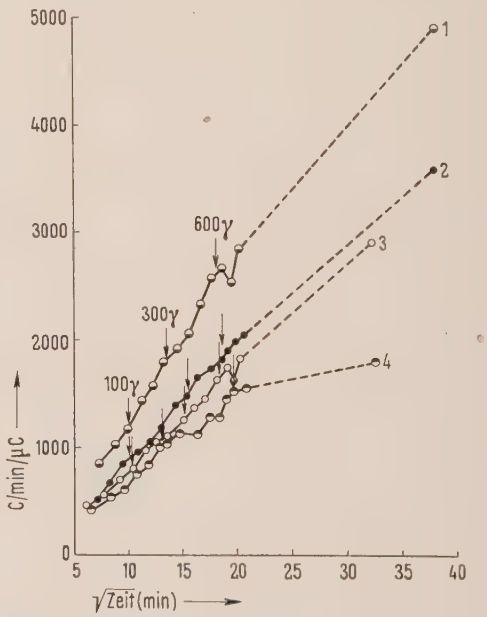


Fig. 11. Die Wirkung von J^--Einnahme auf die Aufnahme von J^{131} durch die Schilddrüse.

[56] P. PELTOLA, Duodecim *76*, 279 (1960).
[57] P. PELTOLA, Acta endocrin. *34*, 121 (1960).
[58] A. I. VIRTANEN und E. VIRTANEN, Acta med. scand. *105*, 268 (1940).

Jodgehaltes gruppiert wurden, konnte man feststellen, dass 14,3% der Mädchen sehr geringe Jodmengen (15–16 γ/l) im Urin aufwiesen, wogegen solch niedere Werte im Urin von Menschen in Südwestfinnland (nicht-Strumagebiet) gar nicht und 17–19 γ/l selten angetroffen wurden. Auf Grund der Urinanalysen wurde angenommen, dass der Jodgehalt der Nahrung in Finnland im allgemeinen zu niedrig und die endemische Struma offenbar auf Jodmangel zurückzuführen sei[59]. VILKKI[60] hat später eine umfangreiche Untersuchung über den Jodgehalt der wichtigsten in Finnland gebrauchten Nahrungsmittel ausgeführt. Nach seinen Angaben enthält die tägliche Nahrung in Südwestfinnland 71 γ J/Tag und im Seengebiet 58 γ J/Tag. Diese Ergebnisse stimmen mit dem Jodgehalt der Urinproben gut überein. Der Jodgehalt der Milch ist als Jodquelle sehr wichtig in unserem Land, wo viel Milch getrunken wird.

PELTOLA[56,57] hat neulich auf Grund zweier langdauernder Rattenversuche, bei denen nur die Gewichte der Schilddrüsen bestimmt wurden, die Schlussfolgerung gezogen, dass die endemische Struma in Finnland wahrscheinlich zunächst auf die in Milch enthaltenen strumigenen Substanzen und nicht auf Jodmangel zurückzuführen ist. Leider ist sein Beweismaterial sehr unvollständig. Die Milchproben sind zum Beispiel Gegenden entnommen, die nur etwa 40 km voneinander entfernt sind. Eine von diesen Gegenden ist eine Stadt, die ihre Milch aus einer Entfernung von einigen zehn Kilometern bekommt. Über die Art der Viehfütterung war nichts bekannt. Die histologische Auswertung der Schilddrüsen sowie die Bestimmung der Jodfraktionen im Serum sind nicht ausgeführt worden. Im andern Versuch, der ein Jahr dauerte, war die tägliche Jodmenge so enorm wie 150 γ J/Ratte. Auf Grund der Versuche von PELTOLA ist es unmöglich, Schlussfolgerungen zu ziehen.

Nach unseren oben angeführten Arbeiten werden so kleine Mengen der bisher bekannten, die Schilddrüsenfunktion hemmenden Substanzen vom Futter in die Milch übergeführt, dass sie der Milch keine strumigenen Eigenschaften geben können. Die Versuche an Menschen und Ratten betreffend die Überführung von eventuell unbekannten, in Pflanzen vorkommenden strumigenen Substanzen haben in diesem Institut zu negativen Resultaten geführt. Mit anderen Worten: Es ist uns bisher nicht gelungen, durch irgendeine Fütterung die Milch strumigen zu machen.

Summary. The chemistry, and also the importance of goitrogenic substances derived from vegetables or fodder plants is dealt with. The most important new results are the following:

(1) The precursor of SCN^-, glucobrassicin, was isolated from plants belonging to the *Brassica* family. Its structure was established. It is a thioglucoside containing an indole group. Its enzymatic decomposition at different pH's was investigated. In addition to esters of *iso*thiocyanic acid, esters of thiocyanic acid were also found to be formed from thioglucosides in some plants by 'myrosinase'.

(2) Enzymatic formation of vinylthio-oxazolidone was found to occur also in the green parts of crushed *Brassica* plants. This antithyroid substance was determined in cabbage, marrow kale, and numerous other fodder plants.

(3) The transfer of both SCN^- and vinylthio-oxazolidone to milk was determined in experiments with cows. The amount of both substances transferred to milk was so small that it cannot make milk goitrogenic. The goitrogenic properties of milk produced by different kinds of feeding was investigated in human and rat experiments. Milk with goitrogenic properties could not be produced with any kind of feeding. Different experiments were performed to find the cause of the contradictory results presented in the literature.

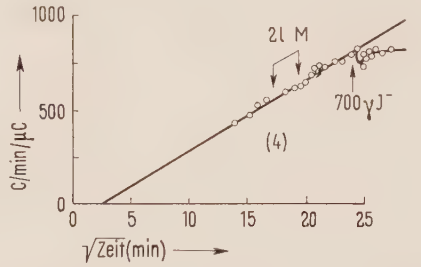


Fig. 12. Die Wirkung von J^--Einnahme auf die Aufnahme von J^{131} durch die Schilddrüse nach der Einnahme von Milch.

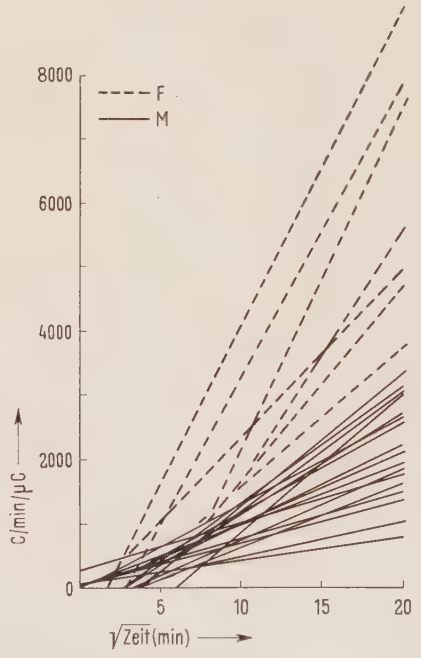


Fig. 13. Relative Aufnahmen von J^{131} durch die Schilddrüse bei Frauen (F) und Männern (M).

[59] A. I. VIRTANEN, Duodecim *63*, 488 (1947).
[60] P. VILKKI, Ann. Acad. Sci. Fenn. A. II *1956*, 71.

Brèves communications – Kurze Mitteilungen – Brevi comunicazioni – Brief Reports

Les auteurs sont seuls responsables des opinions exprimées dans ces communications. – Für die kurzen Mitteilungen ist ausschliesslich der Autor verantwortlich. – Per le brevi comunicazioni è responsabile solo l'autore. – The editors do not hold themselves responsible for the opinions expressed by their correspondents.

I sedimenti del lago di Monterosi[1]

Lo studio dei sedimenti del lago craterico di Monterosi sembra poter offrire motivi di particolare interesse da molti punti di vista. Si tratta di un piccolo lago[2] dell'Italia Centrale, situato in un'area di intenso vulcanismo quaternario le cui fasi principali ebbero luogo nell'interglaciale Mindel-Riss e nel Riss, e la cui estinzione si ritiene avvenuta verso la fine dell'interstadiale Wurm 2–Wurm 3[3,4]. Supponendo in questa epoca la data d'origine del lago, il deposito di questo dovrebbe racchiudere una storia continua comprendente almeno parte dell'ultimo Glaciale. Inoltre Monterosi, privo di immissario ed emissario e con un limitatissimo bacino imbrifero, costituisce un sistema relativamente isolato, in cui le variabili che influiscono sulla sedimentazione sono molto ridotte. Ciò rende più facile il risalire ai fattori più generali influenzanti la sedimentazione e l'ottenere dati sull'evoluzione geochimica e biologica del lago, climatica e geologica della regione. Si aggiunga che il lago si trova al centro d'un area di estremo interesse archeologico: dati utili a questa scienza sono ricavati dai sedimenti di Monterosi.

Mediante un «Livingstone piston corer» sono state estratte due carote di circa 3,20 m ciascuna nei pressi del centro del lago[5]. In entrambi i casi alla profondità di 3,20 m si incontrava uno strato sabbioso imperforabile, probabilmente la base del deposito lacustre. In questa nota riporto solo qualche dato parziale dalle analisi polliniche dei sedimenti (Fig.) che in forma completa sarà oggetto di una prossima pubblicazione. Senza entrare nei particolari posso dire quanto segue:

Alla base del nostro deposito nella regione non esisteva vegetazione forestale (Diagr. A). Tra le specie erbacee si aveva un'assoluta prevalenza di *Artemisia* (Diagr. C). La regione doveva essere in una situazione molto simile a quella della «tundra», fatto straordinario a tale latitudine, ed indicante un clima molto più freddo dell'attuale. Questa situazione, pur con qualche oscillazione, permaneva fino alla profondità di 203 cm, quando cessava la preponderanza di *Artemisia* e compariva improvvisamente il *Corylus* (Diagr. D). Questa specie è riportata spesso come precursore all'impiantamento di una copertura forestale. Infatti subito dopo i pollini arborei divengono sempre più abbondanti (Diagr. A). Ho schematizzato (Diagr. B) la

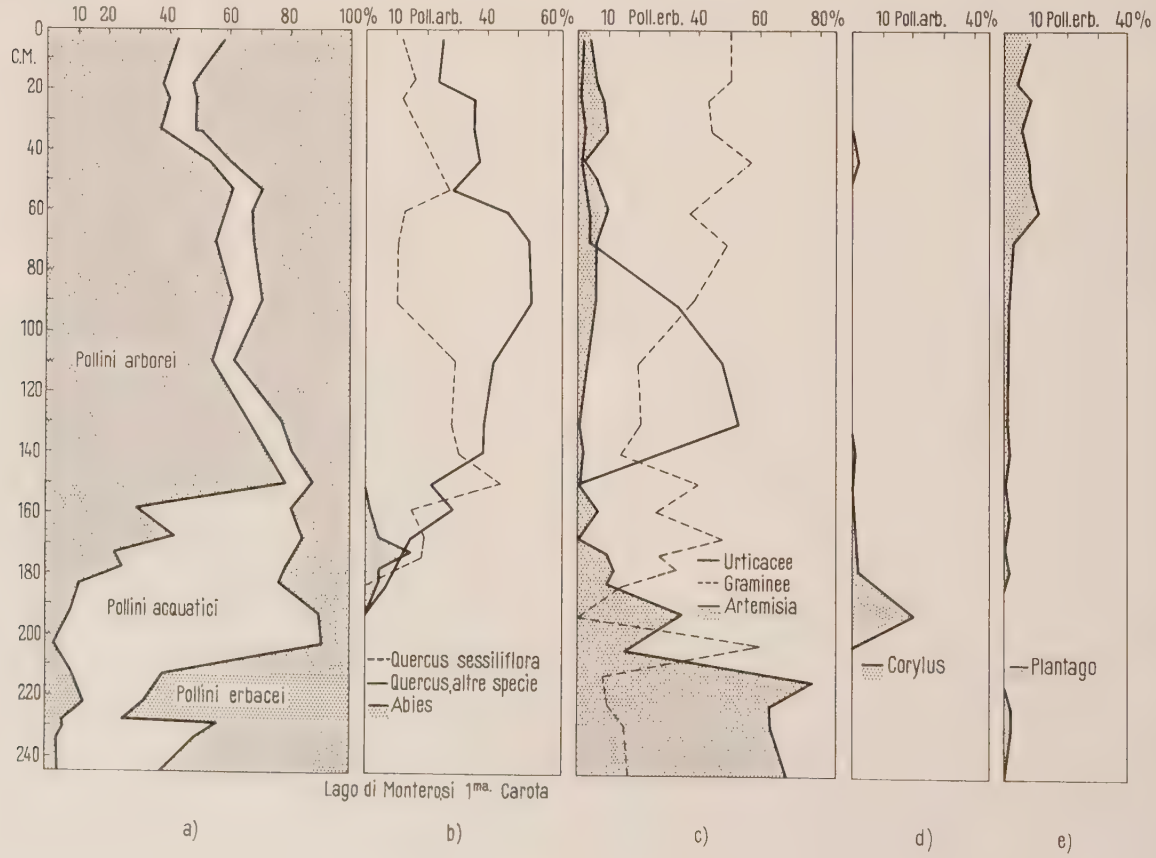
[1] Questo lavoro è stato eseguito nell'Osborn Zoological Laboratory, Yale University, New Haven (Conn.) con supporto della National Science Foundation, Washington (D.C.).

[2] Lago di forma circolare; circonferenza circa 2 km; profondità massima circa 6 m; altezza sul livello del mare 237 m.

[3] C. BLANC, E. TONGIORGI e L. TREVISAN, *Le Pliocène et le Quaternaire aux alentours de Rome* (INQUA, Roma 1953).

[4] P. MODERNI, *Le bocche eruttive dei vulcani Sabatini*. Bollettino Comitato Geologico, Firenze (1896).

[5] Prezioso in tale occasione risultava l'aiuto del Prof. EDMONDSON e del Dott. G. BAZZICHELLI.



storia forestale documentata dai sedimenti di Monterosi, prendendo in considerazione solo tre specie, cioè *Abies*, *Quercus sessiflora* (specie di quercia favorita da ambiente più fresco), e altre specie di quercia di ambiente più temperato, raggruppate insieme. Come si può osservare il clima va sempre più migliorando dalla situazione tipo «tundra». La punta di *Abies* indica sempre un clima fresco ed umido che va evolvendo verso situazioni più calde con oscillazioni documentate dalle rispettive variazioni dei due tipi di quercia. Più di una interpretazione cronologica è possibile dei diagrammi, ed una definitiva sarà possibile quando in possesso di maggiori dati e di datazioni con il radiocarbonio. La più probabile, anche sulla base di una correlazione con un'altro diagramma pollinico della stessa regione[6], mi sembra quella che attribuisce la zona ad *Artemisia* al pieno «Wurm 3», l'oscillazione di 160 cm (Diagr. B) all'«Allerod»; il massimo di quella che possiamo chiamare «quercia inferiore» di 70–90 cm (Diagr. B) all'«Ipsotermico»[7].

Difficile dare una stima precisa dell'intervallo di tempo racchiuso nel deposito di Monterosi, ma secondo l'interpretazione data sopra dovrebbe essere di poco minore di 20000 anni.

I numerosi dati ricavati dalle analisi polliniche dei sedimenti di Monterosi saranno trattati in dettaglio in una futura nota. Sarà discusso il diagramma completo nel quadro della stratigrafia del Quaternario recente italiano, e molti altri fatti di un certo interesse, quali ad esempio la storia forestale della regione, l'evoluzione delle piante acquatiche del lago (di cui si può avere un'idea dal Diagr. A), etc. Inoltre per quanto riguardo l'archeologia, ritengo sposibile datare gli inizii della pratica dell'agricoltura nella regione. A questo proposito interessante è l'andamento del polline di *Plantago*[8], mostrato nel Diagr. E, e l'aumento percentuale che le specie erbacee mostrano nei 50 cm superiori del sedimento (Diagr. A).

Molto lavoro, sotto la direzione di G. E. Hutchinson della Yale University, USA, è in corso sui sedimenti di Monterosi (analisi chimiche, mineralogia della frazione argillosa, microfossili animali, diatomee, etc.). La correlazione dei diversi dati sembra poter fornire interessanti notizie sulla sedimentazione lacustre.

Summary. This note is a preliminary report on some research being carried out at present on the sediments of Monterosi, a volcanic lake of Central Italy, under the direction of Prof. G. E. Hutchinson, of Yale University, USA. Herein are given some data taken from the pollen analysis of cores of the lake's sediments. The first results seem promising for the stratigraphy of the recent Quaternary Age in Central Italy, and for other related problems.

E. Bonatti

Scripps Institution of Oceanography, La Jolla (Calif.), December 9, 1960.

[6] E. Bonatti, *Ricerche sui sedimenti di un lago quaternario del Lazio*, in stampa.
[7] E. S. Deevey e R. F. Flint, Science *125*, 182 (1957).
[8] J. Iversen, *The Influence of Prehistoric Man on Vegetation.* Danmarks Geologiske Undersögelse (1949).

Periodic Acid Oxidation of the Steroid 11β-Hydroxyl Group

The scope of oxidations with periodic acid has been reviewed by Bobbitt[1] but in steroid chemistry the use of this agent has been almost completely limited to the oxidation of glycol or ketol structures. During the course of other work in which cortisol was being oxidized with periodic acid it was noticed that in addition to the expected product, 11β-hydroxyandrost-4-ene-3,17-dione, there was a less polar compound which behaved chromatographically as androst-4-ene-3,11,17-trione. Further investigation has shown that it is possible to achieve with periodic acid a selective oxidation of the 11β-hydroxyl group in the presence of other isolated hydroxyl groups.

The scope of the oxidation was investigated on a micro scale by adding 1 ml aqueous periodic acid solutions (0.18, 0.135, 0.09, 0.045, 0.0225 *M*) to 20 μg steroid in 0.1 ml methanol and allowing the reaction to take place over 24 h in the dark at room temperature. The oxidation products were extracted and examined by paper chromatography. Table I shows the concentration of periodic acid required for 50% conversion of the 11β-hydroxyl group of various steroids and also shows that, as expected, the 11α-hydroxyl group was much more resistant to attack. Table II shows that hydroxyl groups at other positions in the steroid nucleus were only slowly attacked with high concentrations of periodic acid, a detectable change being

[1] J. M. Bobbitt, Adv. Carb. Chem. (New York) *11*, 1 (1956).

Tab. I

Steroid	Molarity of periodic acid for 50% conversion to the 11 oxo-compound
11β-Hydroxyandrost-4-ene-3,17-dione	0.045
11β,17β-Dihydroxyandrost-4-en-3-one	0.045
11β-Hydroxypregn-4-ene-3,20-dione	0.045
11α-Hydroxyandrost-4-ene-3,17-dione	0.135
11β-Hydroxyandrost-1,4-diene-3,17-dione	0.09
9α-Fluoro-11β,17β-dihydroxy-17α-methylandrost-4-ene-3-one	> 0.18
3α,11β-Dihydroxy-5α-androstan-17-one	0.023
3α,11β-Dihydroxy-5β-androstan-17-one	0.023

Tab. II

Steroid	Molarity of periodic acid for any change to be detected
6β-Hydroxyandrost-4-ene-3,17-dione	0.18 *M*
3β,6β-Dihydroxy-5α-cholestane	no change at 0.18 *M*
3α,7α,12α-Trihydroxy-5β-cholanic acid	no change at 0.18 *M*
11β,17β-Dihydroxyandrost-4-en-3-one (17β-OH → 17-oxo)	0.09 *M*
3α,11β-Dihydroxy-5α-androstan-17-one (3α-OH → 3C=O)	0.09 *M*
3α,11β-Dihydroxy-5β-androstan-17-one (3α-OH → 3C=O)	0.09 *M*
3-Methoxy-16β-hydroxyoestra-1,3,5(10)-triene (16β-OH → 16C=O)	0.18 *M*

5% conversion of the starting material. Similar results using chromic acid oxidation were obtained by SCHREIBER and ESCHENMOSER[2]. Oestrogens, unless methylated at position 3, were attacked, presumably in ring A[3] and dehydroepiandrosterone was also oxidized; it has been shown[4] that periodate will attack the Δ^5 bond of cholesterol with the formation of the 5α,6β-glycol.

The rate of oxidation of the 11β-hydroxyl group was increased by increasing the concentration of methanol in the reaction mixture but decreased by ethanol. It has been shown that methanol decreases the pH of periodic acid solutions[5]. The rate of reaction at pH 4.5 was less than one tenth of that at pH 1.6, the pH of 0.09 *M* periodic acid.

To obtain conclusive evidence of the structure of the oxidation product of 11β-hydroxyandrostenedione, 8.6 mg of this steroid in 43 ml methanol were oxidized with 430 ml 0.09 *M* periodic acid solution in the dark at room temperature for 24 h. The oxidation product was separated from a small amount of unreacted steroid by chromatography on Celite using the solvent system toluene, light petroleum, methanol, water (6.6:3.3:8:2) and recrystallised from ethanol-light petroleum. The crystalline product had m.p. 220–223° (evac. tube) which was not depressed by admixture with authentic androst-4-ene-3, 11,17-trione, and had similar ultra violet and sulphuric acid adsorption spectra to androst-4-ene-3,11,17-trione.

It is interesting to note (Table I) that the introduction of certain substituents into 11β-hydroxyandrost-4-ene-3, 17-dione stabilised the 11β-hydroxyl group towards oxidation with periodic acid. The introduction into the cortisol molecule of these substituents increases the biological activity[6] and plasma half life of the compound[7,8].

Zusammenfassung. Die 11β-Hydroxylgruppe im Steroidmolekül kann selektiv mit Perjodsäure oxydiert werden. Ihre Oxydationsgeschwindigkeit wurde von der Gegenwart substituierender Gruppen im Molekül beeinflusst.

R. A. HARKNESS and K. FOTHERBY

Clinical Endocrinology Research Unit (Medical Research Council), University of Edinburgh (Scotland), February 8, 1961.

[2] J. SCHREIBER and A. ESCHENMOSER, Helv. chim. Acta *38*, 1529 (1958).
[3] A. M. GOLD and E. SCHWENK, J. Amer. chem. Soc. *80*, 5683 (1958).
[4] R. P. GRABER, C. S. SNODDY, JR., H. B. ARNOLD, and N. L. WENDLER, J. org. Chem. *21*, 1517 (1956).
[5] C. E. CROUTHAMEL, A. M. HAYES, and D. S. MARTIN, J. Amer. chem. Soc. *73*, 82 (1951).
[6] L. F. FIESER and M. FIESER, *Steroids* (New York 1959), p. 699.
[7] C. A. NUGENT, K. EIK-NES, and F. H. TYLER, J. clin. Endocrinol. Metab. *19*, 526 (1959).
[8] R. E. PETERSON, J. B. WYNGAARDEN, S. L. GUERRA, B. B. BRODIE, and J. J. BUNIM, J. clin. Investig. *34*, 1779 (1955).

Two Types of Ribonucleic Protein in the Nucleolus of Intestinal Carcinoma in the Newt *Triturus alpestris* Following Injection of Herring Sperm Deoxyribonucleic Acid

Recently, we demonstrated two types of ribonucleoprotein in the nucleolus of tumour cells in the squamous-cell carcinoma of the lizard *Lacerta agilis*[1]. To establish whether a more general significance should be attached to this result, we performed a corresponding investigation with the experimental carcinoma of the intestine in the newt *Triturus alpestris*, following injection of herring sperm deoxyribonucleic acid (injection for eight days with 0.1 ml of 5% solution)[2].

After sacrificing the animals on the 40th day of the experiment, the nucleolar differentiation of the tumour cells was studied by the toluidine blue-molybdate method[3,4]. As in *Lacerta*[1], in this way the ribonucleoprotein of the nuclear sap or parachromatin was coloured deeply purple, the nucleolus partly assuming a green colour. Also in *Triturus*, the existence of two types of ribonucleoprotein, if not actually demonstrated, had thus become highly probable. In the nucleoli, a variable quantity of metachromatic ribonucleoprotein as well as a number of very small vacuoles appeared to be present, remaining unstained by the method referred to. In the interphase cells the metachromatic ribonucleoprotein was most distinct in the form of small granules, hollow spheres or clusters of hollow spheres. Phase-microscopically, the nucleoli of the living tumour cells contained numerous very small vacuoles.

Comparing the nucleolus in the toluidine blue-molybdate stained sections with that in the living tumour cell, it could be ascertained that the metachromatic ribonucleoprotein was situated around or in some very small vacuoles. After a pretreatment with ribonuclease or hot trichloroacetic acid[5], this nucleolar ribonucleoprotein was not coloured. In all phases of staining by the toluidine blue-molybdate method, staining could be obtained in the same way as the nuclear parachromatin. Following LOVE and BHARADNAJ[3,4], in this intestinal tumour of *Triturus* therefore it can also be called the nucleolar parachromatin. Just as in the squamous-cell carcinoma of the lizard and the Ehrlich ascites tumour[4], the tumour cells in *Triturus* often persisted throughout the mitosis, without being incorporated in the daughter nucleus. During mitosis the nucleolar parachromatin exhibited a different localization: in the early prophase it was frequently situated at the rim of the nucleolus, disappearing from view during the latter prophase to become clearly visible again in the metaphase, the anaphase and the telophase as a vacuolated nucleolus green-coloured in the toluidine blue-molybdate sections.

LOVE[3] suggested that the nucleolar parachromatin is probably extruded from the nucleolus during the prophase to contribute to the accumulation of the granular parachromatin, which takes place in this period. The data obtained for the *Triturus* tumour may certainly be an argument for this reasoning. The earliest symptom of reformation of the nucleolus in the daughter nucleus was a metachromatic inclusion, afterwards acquiring an outer coating of ribonucleoprotein, staining green in the toluidine blue-molybdate sections, which could be vacuolated as well as amorphous. This nucleolar differentiation of the tumour cells in *Triturus* is undoubtedly related to the special structures known for a long time already in the nucleolus.

[1] A. STOLK, Thesis Utrecht (1950); Proc. Kon. Ned. Akad. Wetensch. *56*, 157 (1953); Nature (London) *182*, 1177 (1958); Naturwiss. *46*, 149, 654 (1959).
[2] A. STOLK, Naturwiss. *47*, 88 (1960).
[3] R. LOVE, Nature (London) *180*, 1338 (1957).
[4] R. LOVE and T. P. BHARADNAY, Nature (London) *183*, 1453 (1959).
[5] J. A. SERRA, Nature (London) *181*, 1544 (1958).

The relationship of the two types of ribonucleoprotein in the nucleolus to the nucleolini[6–8] and the nucleonemata[8] could also be solved with the data obtained for the intestinal tumour of *Triturus*. Also in the tumour cells of *Triturus*, hollow and solid structures resembling the true nucleolini could be demonstrated after staining with iron haematoxylin. The physiochemical differences in ribonucleoprotein, determining differential staining by the toluidine blue-molybdate method, may therefore also be responsible for some differences in the affinity for the haematoxylin. As these results are in good agreement with those obtained in the Ehrlich ascites tumour cells[4] and the squamous-cell carcinoma of *Lacerta*, it would therefore seem that they are certainly of general importance.

Zusammenfassung. Durch cytologische Untersuchungen von Tumorzellen des experimentell beim Molch *Triturus alpestris* erzeugten Darmcarcinoms kann gezeigt werden, das der Nucleolus dieser Tumorzellen zwei Typen von Ribonucleoprotein enthält.

A. Stolk

Department of Histology, Free University, Amsterdam (The Netherlands), February 10, 1961.

6 T. H. Montgomery, J. Morphol. *15*, 265 (1899).
7 M. Heidenhain, *Plasma und Zelle* (Gustav Fischer, Jena 1907).
8 C. Estable and J. R. Sotelo, *Fine Structure of Cells* (Interscience Publ. Inc., New York 1955), p. 170.

Bone Mass Changes in Hens Observed *in vivo* During the Egg Laying Cycle

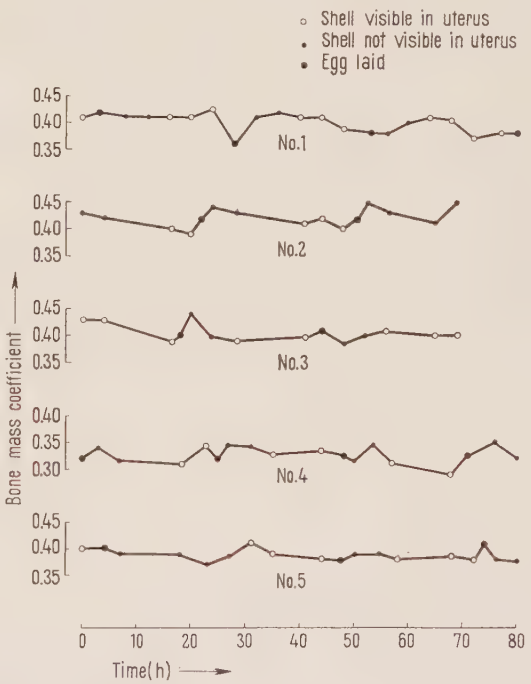
The medullary bone of birds has been observed to undergo marked changes in mineral content and cellular elements in association with the egg laying cycle[1]. Bloom et al.[2] who studied these changes in laying chickens with histological methods noted that there was no correlation between the amount of medullary bone and the position of the egg in the reproductive tract; the observations were terminal ones made on each of a series of birds. The histology of the medullary bone was highly variable among the hens at each stage of the laying cycle, and therefore the magnitude of the mineral changes in a given bird could not be assessed.

Serial quantitative roentgenography is a method for studying the bone changes in a given hen during an egg-laying cycle. Individual patterns of bone formation and destruction can be studied in individual birds over extended periods of time. The technique of quantitative roentgenography has been shown to give a reliable estimate of the bone mineral content or bone density in live rats[3]. In the present study, cyclic changes in the bone mineral content of laying hens are described by employing this technique.

Five white leghorn hens about 18 months of age were kept in individual cages and fed a standard breeder mash. Each hen was roentgenographed several times a day for at least three days. Whenever possible, x-ray films were also taken at the time of egg laying. The films were taken in the following manner. An unanesthetized hen was placed on its left side on a cardboard cassette containing an $8 \times 10''$ no-screen film. The left leg was extended and constrained with a clamp. An aluminum-zinc alloy calibration wedge was placed next to the leg and an exposure was made at 55 KVP, 20 MAS and a focal point to film distance of 48 inches. After development, a line across the midpoint of the tibia-tarsus image was selected for the determination of the mineral content at that site by densitometric analysis of the film. The value obtained as a result of this analysis is termed the bone mass coefficient which represents the mass of the aluminum-zinc alloy that would absorb the same amount of x-radiation as the bone site traced. The bone mass coefficient was found to be proportional to the weight of the bone slice scanned[3]. The bones were evaluated twice for each film and the average bone mass coefficient was used as the final value.

To determine the error in the procedure, each of the three control hens was x-rayed ten times in close succession at the end of the experiment. The mean bone mass coefficient, the standard deviation and the range for each hen was 0.27 ± 0.009 (0.26–0.29); 0.40 ± 0.008 (0.39–0.41); and 0.49 ± 0.012 (0.47–0.52). These standard deviations and ranges are almost 2 times smaller than those of the experimental birds whose values are as follows: (1) 0.40 ± 0.018 (0.34–0.43); (2) 0.42 ± 0.017 (0.39–0.45); (3) 0.41 ± 0.016 (0.39–0.44); (4) 0.33 ± 0.016 (0.29–0.35); (5) 0.39 ± 0.011 (0.37–0.41). The magnitude of the standard deviations in the experimental birds probably reflects the rise and fall in medullary bone mineral associated with the egg laying cycle.

Examination of the record of bone mass coefficient versus time for the five hens (Figure) indicates that the bone mineral content (indicated as bone mass coefficient)



The bone mass coefficient records of hens observed for two or more egg laying cycles.

1 W. Bloom, M. A. Bloom, and F. C. McLean, Anat. Rec. *81*, 443 (1941).
2 M. A. Bloom, L. V. Domm, A. V. Nalbandov, and W. Bloom, Amer. J. Anat. *102*, 411 (1958).
3 H. Schraer, R. Schraer, H. G. Trostle, and A. D'Alfonso, Arch. Biochem. Biophys. *83*, 468 (1959).

varies during a laying cycle. The pattern of these changes is not always consistent for the same hen and varies between animals. For hen number 1 the bone mass values decreased as the egg shell calcified. Ovulation of the next egg which usually occurs about $^1/_2$ h after an egg is laid[4], was generally followed by an increase in bone mass suggesting that a stimulus for medullary bone formation occurred possibly associated with estrogen release. The pattern for this hen appeared to be regular. The patterns exhibited by hens 2 and 3 also show a rise in bone mass near the time of ovulation with a leveling off or decline in value as shell calcification proceeds. The pattern demonstrated by hen number 4 is not so clear although shell calcification appears to occur when the bone mass values are low; this hen also had the lowest bone mass values. Hen number 5 did not lay on the day following the first egg. The bone mass decreased apparently until ovulation occurred for the next egg when rising values were noted preceeding shell formation. The accumulated bone mineral then seemed to decrease as shell formation proceeded. The second egg was laid at a low point followed by slightly increasing values coincident with the time of ovulation of the next egg. The third egg was laid at a peak. Either bone formation took place at this time for reasons that are not presently obvious or an error in technique occurred since ovulation evident from egg laying records did not occur for at least 15 h more; this hen also showed the smallest variability in bone mass values during the period of observation (see standard deviation ranges above).

While the number of hens used in this study are insufficient for statistical treatment they seem to confirm the results of Bloom et al.[2] who found no correlation between the extent of medullary bone calcification and the position of the egg in the oviduct.

The technique of quantitative roentgenography is particularly useful for studying those physiological and nutritional factors associated with skeletal metabolism. In applying this technique to avain studies in the future, certain facts relating to calcium metabolism in birds appear important. For example, it has been observed that certain chickens lay eggs with thick shells while others lay thin shelled eggs. This may be indicative of individual differences in the mobilization of bone calcium for shell production[5]. Species which lay clutches of eggs spaced so that the events of the laying cycle are clearly distinguishable might produce more regular bone mass patterns[6].

Zusammenfassung. Der Mineralstoffgehalt der Tibia-Fibula von Legehennen, mit quantitativer Röntgenographie *in vivo* bestimmt, scheint während des Legezyklus mehr zu variieren als auf Grund des Fehlers der Methode erwartet werden kann. Eine Korrelation zwischen diesen Änderungen in der Knochenmasse und der Position des Eies im Eileiter konnte bisher nicht gefunden werden.

H. Schraer and Rosemary Schraer

Biophysics Laboratory, Department of Physics, The Pennsylvania State University, University Park (Penn.), December 5, 1960.

[4] D. C. Warren and H. M. Scott, Poultry Sci. *14*, 195 (1935).
[5] C. Tyler, J. agr. Sci. *48*, 171 (1956).
[6] This work was supported by grant A-1292 from the National Institute of Arthritis and Metabolic Diseases, National Institutes of Health, U.S. Department of Health, Education and Welfare.

(+) Lupanine in *Lupinus hilarianus* Benth.

Deulofeu and Gatti[1] isolated (+) hydroxylupanine from the seeds of *L. hilarianus* Benth. This alkaloid seemed to be the only base present in this part of the plant. A re-investigation of the alkaloids present in seeds harvested in December 1959 near the city of Santa Fé (Argentina) permitted again the isolation of a fairly large amount of (+) hydroxylupanine.

When the ether mother liquors remaining after the separation of this base were essayed on ascending paper chromatography on Whatman 1, employing butanol:acetic acid:water (80:3:17) as mobile phase, two spots were detected employing Dragendorff reagent. One, with Rf 0.29, corresponds to hydroxy-lupanine; and the other, with Rf 0.41, to another base, present in a very small amount.

Evaporation of the solution gave a residue that was chromatographed on a column of alumina (Woelm, grade III). Elution with a mixture of benzene-cyclohexane (50:50) gave the base with Rf 0.41. Elution of the hydroxylupanine was effected by using a larger amount of benzene in the mixture (70:30).

The base giving the spot with Rf 0.41 was identified as (+) lupanine. On evaporation of the solution, a syrup was obtained from which the following derivatives could be prepared: perchlorate, m.p. 211–213° $(\alpha)_D^{25°} + 40.0°$ (*c*, 0.3 ethanol); hydriodide m.p. 188–189°; methiodide m.p. 256–257°; all values in agreement with those given in the literature[2]. The m.p. of the perchlorate was not depressed when mixed with an authentic sample of (+) lupanine perchlorate. The Rf 0.41 was also given by the authentic base.

It is interesting that all species of *Lupinus*, seven in total[2], in which (+) hydroxylupanine has been found, contain also (+) lupanine, both bases having the same stereochemical configuration in carbons 6 and 11. *L. albus* is the only species from which, in addition, the stereoisomeric (−) lupanine has been isolated as such[3]; the latter isomer is present in form of the racemate also in the seeds of *L. angustifolius*[4].

Zusammenfassung. (+)-Lupanin wurde aus den Samen der *L. hilarianus* Benth. isoliert.

B. Frydman and V. Deulofeu[5]

Laboratorios de Investigación, E.R.Squibb & Sons Argentina S.A., Martínez (Prov. Buenos Aires, Argentina), February 6, 1961.

[1] V. Deulofeu and A. Gatti, J. org. Chem. *10*, 179 (1945).
[2] N. J. Leonard, *The Alkaloids* (R. H. F. Manske and H. L. Holmes, Academic Press Inc., New York 1953), Vol. III, p. 119; Vol. VII, p. 253.
[3] E. P. White, New Zealand J. Sci. Technol. *B 38*, 718 (1957).
[4] A. P. Pellet, Ann. Pharm. Franc. *8*, 551 (1950).
[5] We thank Prof. N. J. Leonard (Urbana, Illinois) and I. Ribas (Santiago, Spain) for the generous gift of samples of (+) lupanine perchlorate.

Konstitutionschemische Bedingungen für die Wirksamkeit von Oxytryptaminderivaten im Strahlenschutzversuch

Die hervorragende Wirksamkeit des biogenen Amins Serotonin[1] im Strahlenschutzversuch, auf die erstmals die Arbeitsgruppen von GRAY[2] und BACQ[3] aufmerksam gemacht haben, war Gegenstand mehrfacher Untersuchungen[4] und wurde besonders von LANGENDORFF et al.[5] quantitativ genau erfasst. Man weiss auch, dass Sauerstoffüberdruck[6] und Antagonisten des Serotonins[7] seinen Schutzeffekt zu vermindern oder völlig aufzuheben vermögen. Der Wirkungsmechanismus der Verbindung indessen ist, wie der der meisten anderen Schutzsubstanzen, noch umstritten.

Im Rahmen einer demnächst zur Veröffentlichung gelangenden grösseren experimentellen Arbeit zu dieser Frage sahen wir uns veranlasst, Abkömmlinge des Serotonins (5-Hydroxy-tryptamin) auf ihre Aktivität im Strahlenschutzversuch zu prüfen[8].

Material und Methode. Weibliche weisse Mäuse des Basler Bürgerspital-Inzuchtstammes im Durchschnittsgewicht von 17 g erhielten eine einmalige Ganzkörperbestrahlung von 900 bzw. 1050 r unter den folgenden Bedingungen: Röntgenapparatur Siemens Stabilipan, 200 kV, 20 mA, 0,5 mm Cu-Filter, Abstand Fokus–Tier 50 cm, Feldgrösse 17×17 cm. Je 10 Tiere wurden zusammen in einem Kästchen mit Seitenwänden von 4 cm Buchenholz bestrahlt, so dass am Rande des Käfigs dieselbe Seitenstreuung herrschte wie im Innern. Die Dosisleistung in der Mitte des Käfigs (mit Streukörper) betrug 95,0 r/min[9].

5 min vor der Bestrahlung wurden den Tieren jeweils 50 mg/kg der fraglichen Schutzsubstanz intraperitoneal injiziert. In entsprechenden Vorversuchen erwies sich keines der verwendeten Präparate als toxisch. Kontrollen, die nur die von uns verwendeten Lösungsmittel erhielten (0,5% Weinsäure oder *Aqua dest.* in einem Volumen von 0,1 ml/10 g Maus) unterschieden sich nicht von den Kontrollen, die überhaupt nicht vorbehandelt wurden.

Alle Tiere erhielten überdies während der ersten 7 Tage nach der Bestrahlung 0,2 mg Reverin s.c./Tag, um unspezifische Infektionen auszuschliessen. Die regelmässige Wartung war garantiert.

Als Kriterium für die Schutzwirkung diente die Überlebensquote am 30. Tag *post radiationem*.

Zur statistischen Sicherung unserer Resultate prüften wir die mittleren Überlebenszeiten der zu vergleichenden Tiergruppen mit dem t-Test, wobei wir für die den 30. Tag Überlebenden den Wert 30 einsetzten.

Die *Ergebnisse* zeigt die Tabelle. Die Figur zeigt die chemische Konstitution der von uns geprüften Verbindungen.

Der Unterschied der durchschnittlichen Überlebensdauer der mit Serotonin, 5-Methoxy-tryptamin und 5-Hydroxy-ω-N,N-monomethyl-tryptamin vorbehandelten Tiere zu der der Kontrollen ist mit $p < 0{,}001$ hoch signifikant. Auch dem 4-Hydroxy-tryptamin kommt wahrscheinlich eine geringe Schutzwirkung zu, die aber nur im höheren Dosisbereich (1050 r) zu einer eben noch signifikanten Verlängerung ($p = 0{,}02$–$0{,}01$) der mittleren Überlebenszeit führt.

Zwischen dem Ausmass der Schutzwirkung von Serotonin, 5-Methoxy-tryptamin und 5-Hydroxy-ω-N,N-monomethyl-tryptamin bestehen keine statistisch gesicherten Unterschiede.

Alle anderen von uns geprüften Oxytryptaminderivate erwiesen sich als wirkungslos.

Interessant ist die hohe Spezifität der Serotoninstruktur für die Strahlenschutzwirkung. Während die Methylierung der 5-Hydroxygruppe oder der endständigen Aminogruppe den Schutzeffekt der Verbindung überhaupt nicht tangiert, führt die Acetylierung oder doppelte Methylierung des endständigen Stickstoffs zu völligem Wirkungsverlust im Strahlenschutzversuch. Auch die Methylierung des Indolstickstoffs hebt den Schutzeffekt auf.

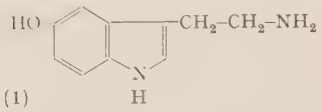
Wird die Hydroxygruppe von Stellung 5 nach Stellung 4 verschoben, so resultiert eine starke Wirkungsverminde-

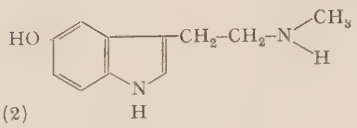
[1] Übersicht bei A. CERLETTI, Helv. med. Acta *25*, 330 (1958).
[2] J. L. GRAY, E. J. MOULDEN, J. T. TEW und H. JENSEN, Proc. Soc. exp. Biol. Med. *80*, 604 (1952).
[3] Z. M. BACQ und A. HERVE, Schweiz. Med. Wschr. *82*, 1018 (1952).
[4] Übersicht bei H. J. MELCHING, Dtsch. Med. Wschr. *85*, 2284 (1960).
[5] H. LANGENDORFF, H. J. MELCHING und H. A. LADNER, Strahlenther. *108*, 251 (1959).
[6] H. A. S. VAN DEN BRENK und R. MOORE, Nature *183*, 1530 (1959).
[7] H. A. S. VAN DEN BRENK und K. ELIOTT, Nature *182*, 1506 (1958). – H. LANGENDORFF, H. J. MELCHING und H. A. LADNER, Strahlenther. *109*, 554 (1959).
[8] Alle Oxytryptaminverbindungen, über die hier berichtet wird, wurden in den Laboratorien der Sandoz A.G. Basel synthetisiert und uns freundlicherweise zur Verfügung gestellt.
[9] Wir danken Herrn Dr. H. LÜTHY, dem Physiker des Basler Universitäts-Röntgeninstitutes, für seine liebenswürdige Unterstützung.

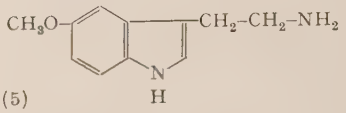
Vorbehandelt mit	Röntgendosis 900 r			Röntgendosis 1050 r		
	I	II	III	I	II	III
(1) 5-Hydroxy-tryptamin-Kreatininsulfat	20	100%	30	20	65%	23,5
(2) 5-Hydroxy-ω-N,N-monomethyl-tryptamin-Bioxalat	20	100%	30			
(3) 5-Hydroxy-ω-N,N-dimethyl-tryptamin-Bioxalat	20	5%	7,8			
(4) 1-Methyl-5-hydroxy-tryptamin-Kreatininsulfat	20	0%	6,6			
(5) 5-Methoxy-tryptamin (Base)	20	80%	25,6	20	60%	22,5
(6) 5-Methoxy-ω-N,N-acetyl-tryptamin (Base)	20	0%	7,2			
(7) 4-Hydroxy-tryptamin-Oxalat	40	12,5%	10,2	20	5%	9,0
(8) 4-Hydroxy-ω-N,N-monomethyl-tryptamin-Oxalat	20	0%	6,5			
(9) 4-Hydroxy-ω-N,N-dimethyl-tryptamin (Base)	20	0%	6,2			
(10) 4-Hydroxy-α-methyl-tryptamin-Bimaleinat	20	0%	8,6			
Kontrollen	40	2,5%	7,9	20	0%	5,3

I = Anzahl der verwendeten Tiere II = Überlebende am 30. Tag *post radiationem* III = mittlere Überlebenszeit in Tagen *post radiationem*

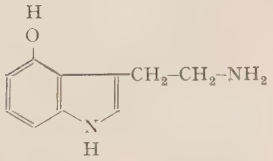
Gute Strahlenschutzwirkung


(1)

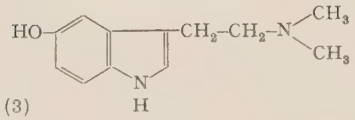

(2)

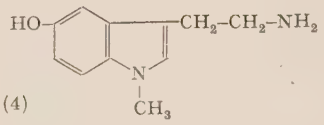

(5)

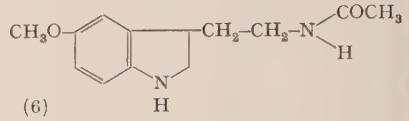
Schwache Strahlenschutzwirkung

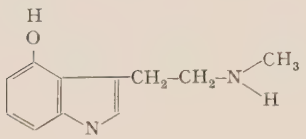

(7)

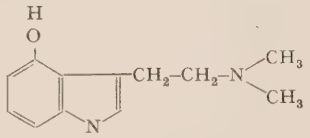
Keine Strahlenschutzwirkung

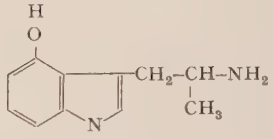

(3)


(4)


(6)


(8)


(9)


(10)

rung. Diese geringe schützende Aktivität des 4-Hydroxytryptamins geht aber sowohl nach Methylierung oder Dimethylierung des endständigen Stickstoffs als auch nach Substitution einer Methylgruppe in Stellung α völlig verloren.

Dabei scheint uns wesentlich, dass die Strahlenschutzwirksamkeit der substituierten Oxyindolderivate keine strenge Parallelität zu deren pharmakologischem Charakter aufweist[10]. Dies gilt insbesondere auch für die quantitative Wirkung der von uns verwendeten Substanzen am isolierten Rattenuterus[11].

Unsere Befunde scheinen geeignet, den strahlenbiologischen Wirkungsmechanismus des Serotonins genauer zu definieren. Wir werden darüber andernorts im Rahmen weiterer experimenteller Ergebnisse berichten.

Summary. Mice receiving a lethal dose of whole body irradiation are protected by 5-methoxy-tryptamine or 5-hydroxy-ω-N, N-monomethyltryptamine to the same extent as by serotonin. Other derivatives of oxytryptamine have only slight or no protective properties against irradiation.

P. DUKOR und R. SCHUPPLI

Dermatologische Universitätsklinik Basel, 16. März 1961.

[10] J. R. VANE, Brit. J. Pharmacol. *14*, 87 (1959). – M. J. GREENBERG, Brit. J. Pharmacol. *15*, 375 (1960). – H. WEIDMANN und A. CERLETTI, Helv. physiol. Acta *18*, 174 (1960).

[11] M. TAESCHLER, persönliche Mitt.

Catalase Synthesis and Destruction in Starvation[1]

In starvation[2] and in the cachexia of the tumor-bearing host[3,4] there is a marked reduction in many of the proteins of the various organs and tissues of the body. Biochemists have been intrigued by this observation but have lacked specific tools with which to elucidate the mechanism by which such reduction takes place, namely whether it results from an increased rate of breakdown or a decreased rate of synthesis of the respective proteins.

Methods have been developed recently in our laboratory[5,6] for determining in the living animal the rates of synthesis and destruction of a single protein, the enzyme catalase. The methods are based on the use of one of two drugs, namely 3-amino-1, 2, 4-triazole (AT) and allylisopropylacetamide (AIA). AT acts by irreversibly inhibiting

[1] Presented in part at the Fifth International Congress on Nutrition, Washington (D.C.) September 1960.

[2] L. L. MILLER, J. biol. Chem. *172*, 113 (1948).

[3] J. P. GREENSTEIN, *Biochemistry of Cancer* (Academic Press, Inc., New York 1954).

[4] M. RECHCIGL, Jr., F. GRANTHAM, and R. E. GREENFIELD, Cancer Res. *21*, 238 (1961).

[5] V. E. PRICE and M. RECHCIGL, Jr., Fed. Proc. *19*, 49 (1960).

[6] V. E. PRICE, M. RECHCIGL, Jr., and R. W. HARTLEY, Jr., Nature *189*, 62 (1961).

catalase without interfering with its resynthesis, while AIA acts by blocking the synthesis of new catalase. In the present work AT was used to destroy the catalase following which a comparison was made of the rates by which the activity of the newly synthesized catalase returned to the plateau value, in starved and in normally fed animals.

Methods. Male Sprague-Dawley rats with an average weight of 205 g at the beginning of the experiments were used throughout. The animals were kept in wire cages with screen bottoms and were allowed to eat and drink *ad libitum*. The composition of the stock diet has been described previously[4]. The animals were divided into four main groups. Two of the groups were injected intraperitoneally with AT, at a level of 1 g/kg of body weight, and the two remaining groups were kept as controls. 18 h after AT administration the food was removed from one of the control and one of the AT groups.

At various points during the experiment 5 rats in each of the four groups were killed by decapitation. The livers were removed and homogenized in a Waring blendor with 50 vol of ice-cold distilled water. Catalase activity was determined on 50 µl aliquots of homogenates, using the modification[7] of the spectrophotometric method of Beers and Sizer[8]. A continuously recording spectrophotometer[9] with a log-absorbance attachment permitted accurate and rapid assays in less than 1 min using relatively low concentrations of substrate (0.01 *M* H_2O_2).

Results and Discussion. The total liver catalase activities of starved and fed animals, with and without AT, are shown in Figure 1. It can be seen that the total liver catalase fell off sharply soon after starvation was begun, both in the control animals and in those which received AT. The AT curve shows that there was actually less catalase being synthesized within the liver.

During starvation, however, the weight of the liver fell rapidly, to $^1/_2$ and $^1/_3$ of normal size in five and ten days, respectively. Therefore when the values are expressed in terms of units per g of liver, as shown in Figure 2, nearly the same rates of catalase synthesis and destruction are observed during the first five days of starvation as in the control animals. From semilogarithmic plots of these data and equations presented previously[6], it could be calculated that during each hour approximately 4.5 units or 25 µg of catalase were being synthesized per g of liver, and that 2.2% of the catalase molecules present were being destroyed.

During the first five days of starvation, therefore, the rate of catalase synthesis per g of liver proceeded as rapidly as in the controls, but since the livers were becoming progressively smaller in size there was less total catalase being synthesized. Since during starvation[10] there is known to be a marked loss of the liver RNA which is essential for protein synthesis, it may be inferred from these data that in the early stages of starvation the animal may control the rate of catalase synthesis by progressively decreasing the number of synthesizing units in proportion to the liver size, but that those synthesizing units which remain may be operating at full activity.

After five days, the starving animal enters a second phase in which the rate of catalase synthesis per g of liver starts to fall, and this continues progressively until death of the animal. It remains to be determined whether this fall in the catalase activity results from a deficiency of certain nutrients or whether it represents a death of liver cells.

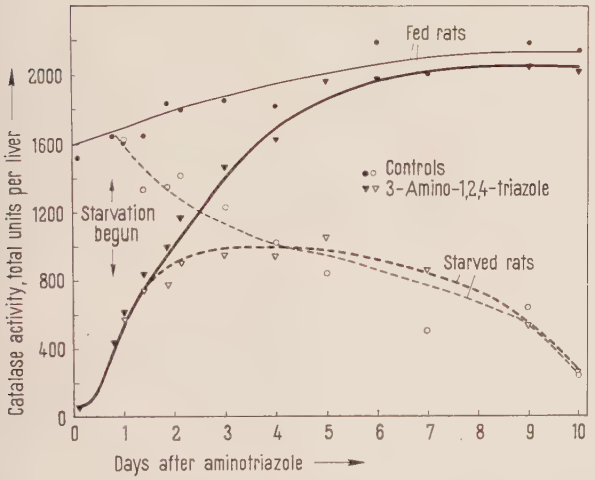


Fig. 1. Liver catalase activity of normal and starved rats following the injection of 3-amino-1,2,4-triazole.

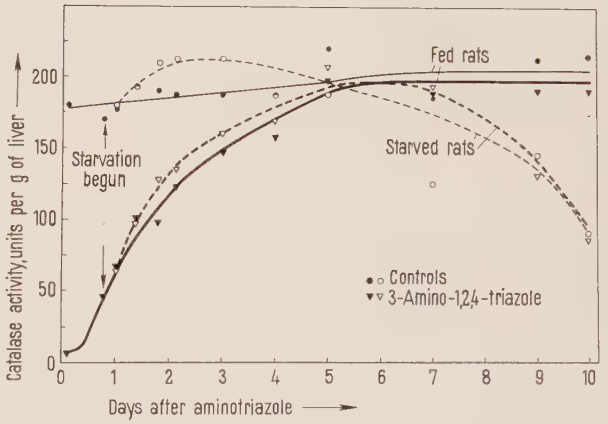


Fig. 2. Liver catalase activity of normal and starved rats following the injection of 3-amino-1,2,4-triazole.

Zusammenfassung. In der Leber hungernder Ratten verliefen Auf- und Abbaugeschwindigkeit der Katalase während der ersten 5 Tage im wesentlichen wie bei den Kontrolltieren. Durch die Verkleinerung der Leber wurde bei den Hungertieren total weniger Katalase in derselben Zeitspanne synthetisiert. Nach 5 Tagen fiel die Geschwindigkeit der Katalase-Synthese pro g Leber allmählich bis zum Tod der Tiere ab.

M. Rechcigl, Jr., and V. E. Price

Laboratory of Biochemistry, National Cancer Institute, National Institutes of Health, Bethesda (Maryland), March 13, 1961.

[7] R. E. Greenfield and V. E. Price, J. biol. Chem. *220*, 607 (1956).
[8] R. F. Beers, Jr., and I. W. Sizer, J. biol. Chem. *195*, 133 (1952).
[9] Cary Model No. 11-MS recording spectrophotometer, Applied Physics Corporation, Pasadena (California).
[10] H. W. Kosterlitz, J. Physiol. *106*, 194 (1947).

Über die Entstehung spezifischer bioaktiver Stoffe in der frühembryonalen Entwicklung der Tiere

Das Wesentliche in der Biochemie der frühesten embryonalen Entwicklung der Tiere ist die allmähliche Umwandlung des Eidotters in stoffwechselaktives Protoplasma[1]. Mit der zur Zeit angewandten Methodik ist es sehr schwierig, den Mechanismus dieser Umwandlung aufzuklären[2].

Seit 1954 arbeiten wir an einer Methode[3–5], die der Erforschung der Embryogenese dienen soll. Es hat sich gezeigt, dass nach der Entfernung der Gallert- und Dotterhülle und bei Verletzung der Zellenmembran des in Entwicklung begriffenen Keimes von *Triturus cristatus* in genau bestimmten Momenten in der Lösung bestimmte chemische Stoffe entstehen; ich nenne sie Stadiumontogenine. Diese Stoffe üben eine spezifische ontogenetische Wirkung aus: Hemmung der Entwicklung von Keimen, die jünger sind als das Verletzungsstadium, Stimulierung gleich alter Keime. Die Entwicklung von Stadien, die älter als das Verletzungsstadium sind, wird gar nicht beeinflusst. Unsere Untersuchungen in den Jahren 1959/60 ergaben, dass Ontogenine nicht nur in ganzen Keimen, sondern auch in Keimteilen gebildet werden. In solchen Fällen bezeichnen wir das Ontogenin mit der Stadiumsnummer und dem Namen des Keimteils.

Die vorliegende Arbeit dient der Untersuchung des Wirkungsmechanismus der verschiedenen Ontogeninstadien. Wir verfolgten die Reaktionen der Stadienontogenine mit verschiedenen Proteiden, die aus den Keimen im Augenblick des Auftretens der entsprechenden Ontogenine isoliert wurden. Wegen der Stellung, die die Ontogenine Nr. 3, 10 und 10a in der embryonalen Entwicklung der Säugetiere einnehmen, richteten wir unser Hauptaugenmerk auf sie[6].

Es wurden jeweils Gruppen von je 10 Embryonen (bzw. die gleiche Anzahl Teile derselben) im gleichen Entwicklungsstadium und Moment der Ontogeninabscheidung nach einer modifizierten Methode nach MIRSKY[7] verarbeitet (10 Keime in 1 ml 0,14 *M* NaCl-Lösung). In einer Versuchsserie trennten wir die DNS vom Protein ab[8]. Alle Fraktionen wurden in der Holtfreterlösung dialysiert und soweit aufgefüllt, dass 0,2 ml Lösung auf einen Keim entfallen. 0,4 ml dieser Fraktionen mischten wir bei 19°C mit 1 ml Ontogeninlösung und prüften die Wirksamkeit der Ontogenine. Die Mischung wurde bei Zimmertemperatur 2 h geschüttelt und dann dekantiert. Hierauf wurden zwei Embryonen in die Lösung gebracht, der eine jünger, der andere älter als der Embryo, der das Ontogenin geliefert hatte. Als Kontrolle dienten entsprechende reine Fraktionen bzw. reine verdünnte Ontogeninlösungen.

Wie die Tabelle zeigt, binden nicht alle Fraktionen die Ontogenine, die im Moment in den Zellen gebildet werden. Im Sinne einer Arbeitshypothese nehmen wir an, dass die nichtbindende Fraktion die Bildungsstätte der Ontogenine ist. Am häufigsten bilden sich Ontogenine in der Fraktion III, also im Dotter, während sie am häufigsten durch DNS-Proteide gebunden werden. In 72% der Fälle stellten wir fest, dass eine solche Mischung (Ontogenin und bindende Proteide) neue Eigenschaften gewinnt: sie stimuliert spezifisch, beschleunigt die Entwicklung der betreffenden Stadien (Verkürzung der Entwicklungszeit um 20–62%), erzeugte Hypertrophie der entsprechenden Embryonalteile. Das aus einem bestimmten Embryonalteil gewonnene Ontogenin hemmt dagegen vor allem die Entwicklung eben dieses Teiles (Fig. 1).

Mit chromatographischen Methoden wurden chemisch reine Ontogenine erhalten, mit denen einige physicochemische Veränderungen während dieser Reaktion verfolgt werden konnten. Das Mischen und Schütteln der Lösung wurde in Quarzküvetten ausgeführt, so dass mehrmals das UV-Spektrum aufgenommen werden konnte. Gleichzeitig wurden jeweils Proben entnommen, die nach Entfernung der Proteide zur chromatographischen Analyse verwendet wurden (Lösung: Isopropanol:HCl).

Die Veränderungen der UV-Spektren in Ontogenin-Proteid-Mischungen zeigten (Fig. 2), dass schon 45 min nach Mischung das Ontogenin aus der Lösung verschwindet (das charakteristische UV-Spektrum ist nicht mehr vorhanden, der chromatographische Streifen, der die Ontogeninaktivität trägt, wird inaktiv). Reagiert das Ontogenin mit DNS-Proteid aus jüngeren Stadien, so bleibt nur das Proteid mit gebundenem Ontogenin in der

[1] E. J. BOELL, Ann. New York Acad. Sci. *49*, 773 (1948).
[2] K. WADDINGTON, in *The Physics and Chemistry of Life* (New York 1958).
[3] G. K. RUSSEW, C. R. Acad. Bulg. Sci. *9*, 97 (1956).
[4] G. K. RUSSEW, Exper. *16*, 329 (1960).
[5] G. K. RUSSEW, J. obstei biologii *21*, 130 (1960).
[6] G. K. RUSSEW, C. R. Acad. Bulg. Sci. *10*, 415 (1957).
[7] A. E. MIRSKY and A. W. POLLISTER, J. gen. Physiol. *30*, 117 (1946).
[8] I. M. GULLAND, D. JORDON, and C. THREFFALL, J. chem. Soc. London *1947*, 1129.

Reaktion zwischen Ontogenin 10 und den Proteiden im Zeitpunkt der Ontogenin-Abscheidung

Ontogenin	Zeit der Ontogeninabscheidung (h Embryonalalter)	Reaktion der Ontogenine mit Proteiden, die aus den Keimen im Augenblick des Auftretens der entsprechenden Ontogenine isoliert werden											
		äusseres Keimblatt				Dotterzellen				dorsale Lippe des Urmunds			
		RNP	DNP DNS	Pr	Fraktion III	RNP	DNP DNS	Pr	Fraktion III	RNP	DNP DNS	Pr	Fraktion III
$10_{\text{Dotterzellen}}$	40.00–42.30	–	–	+	–	×	+	×	–	–	+	–	+
$10_{\text{aeusseres Keimblatt}}$	40.50–41.30	×	+	+	–	+	–	+	–	×	+	–	×
$10_{\text{dorsale Lippe des Urmunds}}$	41.00–42.15	–	–	–	×	+	–	–	–	+	–	×	+
$10'_{\text{Dotterzellen}}$	44.30–45.30	–	–	–	–	×	+	+	–	–	–	–	–
$10a_{\text{dorsale Lippe des Urmunds}}$	48.40–49.10	–	–	–	–	–	–	–	–	×	+	+	–
$10a_{\text{Dotterzellen}}$	49.00–49.35	–	–	–	–	–	+	+	+	–	–	×	+
$10a_{\text{aeusseres Keimblatt}}$	49.30–50.00	–	+	+	+	–	+	–	–	-	-		

1,0 ml Ontogeninlösung (20 biologische Einheiten) + 0,4 ml Lösung der Fraktionen (Menge 2 Keimen entsprechend). RNP Ribonucleinsäureproteide. DNP Desoxyribonucleinsäureproteide. DNS Desoxyribonucleinsäure. Pr entsprechende Proteine. Fraktion III Dotterteil, in Salzlösung unlöslich. + Bindung des Ontogenins (Verschwinden der Wirkung des Ontogenins in der Mischung). – keine Bindung. Das Ontogenin wirkt in der Mischung. × das Gemisch stimuliert spezifisch (Ontogenbildung).

Fig. 1. Spezifisch embryogenetische Wirkung von Stadium-Ontogeninen und Ontogenen, 125 h Embryonalalter. a) Kontrolle, normal entwickelt. b) Als Neuerula in Ontogenin 16_{Kopf} gebracht, Entwicklung gestoppt, Kopf nicht entwickelt. c) Beschleunigte und hypertrophierte Kopfentwicklung in Ontogen 16_{Kopf}. d) Als Neurula in Ontogenin $16_{Neuralrohr}$ gebracht, nicht entwickelt. e) Hypertrophische Entwicklung der Axialorgane in Ontogen $16_{Neuralrohr}$.

Lösung. Nach Reaktion des Ontogenins mit Proteid des gleichen Stadiums tritt 75 min nach Mischung in der Lösung eine neue Substanz auf, die wir Ontogen nennen, charakterisiert durch Rf-Wert und UV-Spektrum[9]. Gleichzeitig erhält die Lösung neue biologische Stimulationseigenschaften.

Die Ontogenine wirken nicht nur in den Zellen, in welchen sie gebildet werden, sondern dringen auch in die benachbarten Zellen ein. Diese Beeinflussung der Umgebung ist besonders stark im Anfang der Gastrulation (Tab.).

Die Tatsache, dass die Ontogenine am häufigsten im Dotter gebildet werden, ausserdem der Umstand, dass fast immer eine Abgabe der Ontogenine aus den dotterreichen vegetativen, entodermalen Teilen an die übrigen Keimteile festzustellen ist, sprechen dafür, dass der Ontogenin-Austausch sehr wahrscheinlich als Ausdruck der Mobilisierung des inerten Dotters und seiner Einbeziehung in die Struktur der aktiven Proteide zu werten ist.

Summary. The autor studied the reaction of stage ontogenins with different proteids, isolated from the embryos at the moment of formation of the respective ontogenin. Not all fractions (least of all the yolk) fix the ontogenins. The DNA-proteids fix them; such a mixture specifically stimulates the development. In these mixtures, new substances are discovered: Ontogens.

G. K. Russew

Medizinisches Forschungsinstitut und Institut für Morphologie an der Bulgarischen Akademie der Wissenschaften, Sofia (Bulgarien), 27. September 1960.

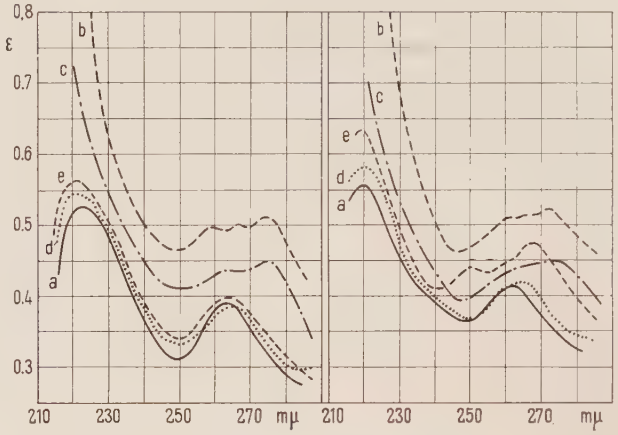


Fig. 2. UV-Spektren bei der Reaktion zwischen Ontogenin 3 und DNS-Proteiden (19° C). Links: a) Reine DNS-Proteide vom Stadium 2/2. b) Reine DNS-Proteide + Ontogenin 3 im Moment der Mischung, Rf bei Ontogenin-Wirkung = 0,59. c) Das gleiche nach 15 min (Rf = 0,59). d) Das gleiche nach 45 min (wird inaktiv). e) Das gleiche nach 75 min (bleibt inaktiv). Rechts: a) Reine DNS-Proteide vom Stadium 3. b) Reine DNS-Proteide + Ontogenin 3 im Moment der Mischung, Rf bei Ontogenin-Wirkung = 0,59. c) Das gleiche nach 15 min (Rf = 0,59). d) Das gleiche nach 45 min (wird inaktiv). e) Das gleiche nach 75 min (Rf bei stimulierender Aktivität von Ontogen 3 = 0,13).

[9] G. K. Russew, C. R. Acad. Bulg. Sci. *13*, 459 (1960).

Artbastarde in der Gattung *Tilapia* (*Cichlidae*, *Teleostei*) und ihr Verhalten

Unlängst hat Whitehead[1] in Kenia Tilapien gefunden, die er als Bastarde von *T. zillii* und *T. nigra* anspricht. Trewavas und Greenwood[2] bezweifeln die Bastardnatur dieser Formen und halten sie für *T. leucostica*. Wir selbst haben nach eingehenden Vorstudien eine Methode der künstlichen Kreuzung entwickelt und mit dieser von mehreren *Tilapia*-Arten voll lebensfähige Bastarde erhalten. *Tilapia*-Hybriden sind für die Verhaltensforschung besonders in den Fällen von Interesse, in denen sich die Stammformen ethologisch sehr weitgehend unterscheiden: ein Elternteil etwa Substratlaicher, der andere Maulbrüter ist. Wir beschränken uns im folgenden auf einige Bemerkungen über das Verhalten von Bastarden *T. mossambica* (Maulbrüter) ♂ × *T. tholloni* (Substratlaicher) ♀ im Jugendstadium, im Vergleich zu dem Verhalten der Elternarten.

Bei den substratlaichenden Tilapien behüten beide Eltern gemeinsam die Jungbrut, die längere Zeit mit ihnen umherwandert. Bei den Maulbrütern nimmt ein Elterntier, und zwar bei den meisten Arten das Weibchen, das Gelege in die Mundhöhle auf. Zu Ende der Embryonalzeit

[1] P. J. Whitehead, Nature *187*, 878 (1960).

[2] E. Trewavas und P. H. Greenwood, Nature *188*, 868 (1960). – Bezüglich der Mitteilung von A. Yashouv und J. Chervinsky, *Hybrids of Tilapia nilotica and T. galilaea*, Nature *184*, 1739 (1959) ist zu sagen, dass es Herr Dr. Yashouv nachträglich doch für nicht genügend gesichert hält, dass tatsächlich Bastarde vorgelegen haben (persönliche Auskunft).

Fig. 1. Protokoll der Bewegung eines *Tilapia mossambica*-Jungen in den ersten 180 sec des Versuchs, Alter 20 Tage. A = Anfang, E = Ende. Die hellere Kreisfläche in der Mitte stellt die Attrappe dar. Durchmesser der Schale (schwarze Fläche) 26 cm. Die Bewegungsfreiheit des Versuchstieres ist im vorliegenden Fall durch den Rand der Schale begrenzt.

Fig. 2. *Tilapia tholloni*. 300 sec. Alter 19 Tage. Sonst wie bei Fig. 1.

entlässt die Mutter die Jungen aus dem Maul. Diese bleiben aber noch eine Zeitlang bei ihr, und bei Beunruhigung nimmt der Mutterfisch sie vorübergehend wieder in die Mundhöhle zurück. Dabei schwimmen die Jungen gerichtet auf den Kopf der Mutter zu, worauf diese die vor der Mundspalte angesammelten Jungen aufschnappt. Bewegt man eine Attrappe, zum Beispiel eine kleine Kugel, vor den Jungen hin und her, so schwimmen diese im typischen Falle sofort bis zur Berührung heran und versuchen gleichsam, in die Attrappe einzudringen. Dabei gleiten sie oft minutenlang, den Kopf mehr oder weniger radiär gegen den Mittelpunkt der Kugel gerichtet, in Kontakt mit der Kugeloberfläche hin und her und lösen sich nur vorübergehend von ihr ab. Ist eine kleine Öffnung in der Attrappe vorhanden, so schlüpfen die Jungfische gelegentlich in diese ein und verweilen kürzer oder länger im Inneren[3].

Um dieses «Kontaktverhalten» der jungen Maulbrüter unter übersichtlichen und definierten Bedingungen studieren und mit dem Verhalten der jungen Substratlaicher vergleichen zu können, haben wir folgende Versuchsanordnung getroffen. Als Elternattrappe verwenden wir eine Glaskugel von 40 mm Durchmesser, die mit rotem Lack bestrichen ist (7 ra-re der 24stufigen Ostwald-Tafel). Sie taucht in das Zentrum einer runden Schale mit Wasser, in der sich das Versuchstier befindet. Während der Dauer des Versuches wird sie mechanisch auf und ab bewegt (im vorliegenden Beispiel mit einer Amplitude von 10 mm und einer Frequenz von 30/min). Der Stiel der Attrappe, ein Glasrohr, verlängert sich in einen Kanal, der im Inneren der Kugel so abgebogen ist, dass er seitlich mit einer Öffnung von 7 mm Durchmesser ausmündet. Das Versuchstier wird von oben durch das Rohr in die Attrappe eingeführt. Bei Beginn des Tests wird es durch die dann einsetzende Bewegung aus der unteren Öffnung herausgespült, wie wenn es vom Mutterfisch aus dem Maul gespien würde.

Die Schale mit dem Versuchstier und der Attrappe befindet sich in einem ringsum geschlossenen Kasten. Die Beobachtung erfolgt von unten durch den Glasboden der Schale. Vermittels einer optischen Vorrichtung werden die Bewegungen des Versuchstieres auf ein Blatt Transparentpapier projiziert, auf dem sie mit einer Tuschefeder fortlaufend nachgezogen werden können. Nach diesem Verfahren wurden die Protokolle der Figuren 1–3 gewonnen.

Figur 1 gibt ein Beispiel für das Verhalten des Maulbrüter-Jungen (*mossambica*). Das Versuchstier hält sich zunächst einige Zeit am Rande der Schale auf. Nach 2 Vorstössen, die auf etwa 2 cm an die Attrappe heranführen, schwimmt es schliesslich gegen die Kugel und kommt in anhaltenden Kontakt mit ihr. Figur 2 erläutert an einem Beispiel das Verhalten eines Versuchstieres der Substratlaicher-Art (*tholloni*) unter den genau gleichen Bedingungen. Es richtet sich zwar wiederholt auf die Attrappe aus, hält sich aber stets in einer gewissen Entfernung von ihr. *Die Bastarde* (*mossambica* ♂ × *tholloni* ♀) *verhalten sich ganz wie die Art des Vaters*, wenn man von gewissen Einzelheiten in der Ontogenese ihrer Reaktionen absieht; sie verhalten sich also wie junge Maulbrüter (Fig. 3). Übrigens wurden die Versuchstiere über einen längeren Zeitraum täglich (teilweise nur alle 2 Tage) getestet, indem sie für ± 15 min der Attrappe ausgesetzt wurden. Ihr Alter lag zwischen 7 und 24 Tagen (27°C Zuchttemperatur). Sie wurden von einem frühen Embryonalstadium an einzeln in einer kleinen Schale gehalten und begannen also völlig erfahrungsfrei.

[3] Eine Auseinandersetzung mit der Literatur und der Anschluss an eigene frühere Arbeiten (PETERS) müssen einer grösseren Publikation vorbehalten bleiben. Man vgl. etwa BAERENDS und BAERENDS-VAN ROON (Behaviour Suppl. I, 1950).

Fig. 3. Bastard *Tilapia mossambica* ♂ × *Tilapia tholloni* ♀. 300 sec. Alter 21 Tage. Sonst wie bei Fig. 1.

Die vorgelegten Beispiele sind typisch. Es wurden insgesamt 54 Einzelversuche mit 11 *mossambica* angestellt, 79 Versuche mit 12 *tholloni* und 121 mit 20 Bastarden. In keinem Falle äusserten die jungen *tholloni* Kontaktverhalten; *bei jedem der Versuchstiere der beiden anderen Gruppen konnte es mindestens während einer Phase von etwa 10 Tagen erzielt werden.* Übrigens waren die Bastarde Halbgeschwister der *tholloni*-Kontrollen und stammten aus dem gleichen Gelege. Ein Teil der als Kontrollen verwendeten *mossambica* hatte den gleichen Vater wie die Bastarde.

Summary. The young of *Tilapia mossambica* (mouthbrooder) show a characteristic 'contact-behaviour', which is related to the behaviour of the mother fish, who takes them back into the mouth cavity in cases of disturbance. This contacting is lacking in the young of *Tilapia tholloni* (substrate spawner). Contacting, as studied in our experiments with models, is genetically determined and is dominant over the *tholloni* pattern in the cross *T. mossambica* ♂ × *T. tholloni* ♀.

H. M. Peters und M. Brestowsky[4]

Zoophysiologisches Institut der Universität Tübingen, 17. März 1961.

[4] Mit Unterstützung durch die Deutsche Forschungsgemeinschaft.

On the Presence of Different Histidine Decarboxylating Enzymes in Mammalian Tissues

In a previous paper, the histidine decarboxylase found in rabbit kidney cortex has been reported to be identical with L-3,4-dihydroxyphenylalanine (DOPA) decarboxylase[1]. At about the same time, Udenfriend, Lovenberg, and Weissbach[2] reached an analogous result working with guinea-pig kidney extracts. Some additional results concerning this problem will be given here.

The enzyme preparations used were obtained from rabbit kidney cortex or foetal rat liver. The tissues were extracted according to Rosengren[1]. The enzymic material was precipitated with ammonium sulphate and dialysed against distilled water at 4°C over-night. The extracts were then incubated in an atmosphere of nitrogen at 37°C and pH 7.8. The histidine decarboxylase activity was estimated by measuring the amount of histamine formed in 3 h. The extraction and purification procedures of histamine were principally the same as those described for catecholamines[3]. The final estimation of histamine was carried out fluorimetrically according to Shore, Burkhalter, and Cohn[4]. A detailed account of the method used will be given elsewhere.

In some experiments, the effect of various substrate concentrations on the rate of histidine decarboxylation in rabbit kidney cortex extracts was studied. The results obtained are given in the Figure. As will be seen from this plot, K_m is very great—about 10^{-1}. This finding raised the interesting question if this enzyme is really responsible for the formation of histamine from histidine in the body under physiological conditions. The reaction appears, indeed, to be effected by DOPA decarboxylase, which is known to be present in large amounts in the rabbit kidney. This opinion is supported by the following observations: 1. The formation of histamine is inhibited by DOPA and by DOPA decarboxylase inhibitors, e.g. caffeic acid, catechol, α-methyl DOPA[5] as observed by us as well as by others[2,6,7]. 2. The decarboxylation of DOPA in kidney extracts is inhibited by addition of large amounts of L-histidine. In a typical experiment 25 μg dopamine was formed in an incubation mixture containing 0.1 ml purified rabbit kidney cortex extract and 200 μg DOPA after 5 min. If 50 mg L-histidine was added together with 200 μg DOPA and incubated under identical conditions, only 14 μg dopamine was formed in the same time. The degree of inhibition is of the order of magnitude that could be expected if the two activities are achieved by one enzyme. 3. The two activities could not be separated during fractionation by means of precipitation with ammonium sulphate or chromatography on a DEAE cellulose column.

The question now arose whether there was another mammalian enzyme that could decarboxylate histidine, as this reaction has been shown to occur after injection of very small amounts of histidine into experimental ani-

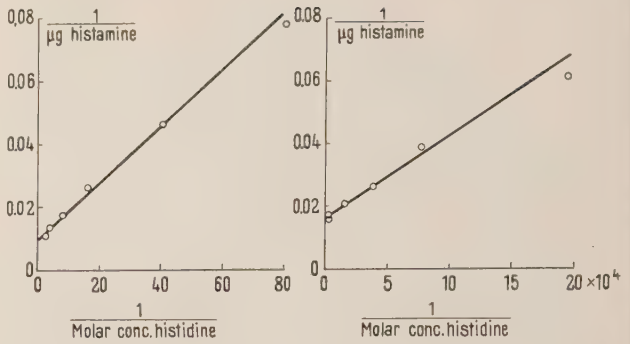
[1] E. Rosengren, Acta physiol. scand. *49*, 364 (1960).
[2] S. Udenfriend, W. M. Lovenberg, and H. Weissbach, Fed. Proc. *19*, 7 (1960).
[3] Å. Bertler, A. Carlsson, and E. Rosengren, Acta physiol. scand. *44*, 273 (1958).
[4] P. A. Shore, A. Burkhalter, and V. H. Cohn, J. Pharmacol. exp. Therap. *127*, 182 (1959).
[5] It is not possible at present to decide if the inhibition of α-methyl DOPA is due to an interference between this substance and histidine at the active center of the enzyme or lack of pyridoxal-5-phosphate. It was found that, under the conditions prevailing, α-methyl DOPA readily reacts with pyridoxal-5-phosphate as determined spectrophotometrically.
[6] E. Werle, Biochem. Z. *311*, 270 (1942).
[7] D. Mackay and D. M. Shepherd, Brit. J. Pharmacol. *15*, 552 (1960).

mals[8]. Such an enzyme seems to occur in the mast cells of the rat and mouse[9,10]. From the investigations of KAHLSON et al.[11], it has appeared that some growing tissues have a high histidine decarboxylase activity. This enzyme has been studied and been found to be of another kind than that found in the rabbit kidney. It has thus been found to have a K_m-value of about 2×10^{-5} (Fig.), which is in the same order of magnitude as the K_m of histidine decarboxylase in mast cells[10]. In contrast to the kidney enzyme, it is not strongly inhibited by the DOPA decarboxylase inhibitors α-methyl DOPA or caffeic acid.

The difference between the K_m-values obtained might be explained by the presence of an endogenous, non-dialysable inhibitor in the kidney extract causing an apparently greater K_m. This possibility seems, however, to be excluded, as the decarboxylation in rat liver extracts was not inhibited on addition of large amounts of the rabbit kidney extract.

In conclusion it may be said that mammalian tissues contain at least two different histidine decarboxylating enzymes: one probably being identical with DOPA decarboxylase and supposedly of no importance for the physiological formation of histamine. The other (or others) is located in mast cells and (or) in growing tissues. As the enzymes differ in several respects, due consideration must be taken of this fact when studying the properties of histidine decarboxylating enzyme systemes.

Zusammenfassung. Säugetiergewebe enthalten mindestens zwei verschiedene, Histidin-decarboxylierende Fermente. Das eine, wahrscheinlich mit Dopadecarboxylase identisch, scheint für die Histaminbildung unter physiologischen Bedingungen ohne Bedeutung zu sein. Das andere ist in Mastzellen und wachsenden Geweben lokalisiert.



Effect of substrate concentration on the rate of histamine formation in rabbit kidney cortex extract (to the left) and on the foetal rat liver extract (to the right). The reciprocal of amine formed per g tissue in 3 h is plotted against the reciprocal of histidine concentration.

P. O. GANROT, A. M. ROSENGREN, and E. ROSENGREN[12]

Department of Pharmacology, University of Lund (Sweden), January 20, 1961.

[8] S.-E. LINDELL and R. W. SCHAYER, Brit. J. Pharmacol. *13*, 89 (1958).
[9] R. W. SCHAYER, Amer. J. Physiol. *186*, 199 (1956).
[10] P. HAGEN, N. WEINER, S. ONO, and FU-LI LEE, J. Pharmacol. exp. Therap. *130*, 9 (1960).
[11] G. KAHLSON, E. ROSENGREN, H. WESTLING, and T. WHITE, J. Physiol. *144*, 337 (1958).
[12] This work has been supported by grants from the Swedish Medical Research Council.

Effect of a Fraction of Bovine Hypothalamic Extract on the Release of TSH by Rat Adenohypophyses *in vitro*

It was found in previous experiments[1] that the non-protein fraction of rabbit and bovine hypothalamic extracts activates adenohypophysial acid phosphatases *in vitro*. A relationship was also found between the activity of adenohypophysial acid phosphatases and TSH secretion *in vivo*[2]. The hypothesis that the acid phosphatase-activating factor is the TSH-releasing factor of the hypothalamus was previously tested in experiments *in vivo*, and it was shown[3] that the fraction activates the secretion of TSH from rat adenohypophysial autografts in the anterior chamber of the eye of hypophysectomized rats.

The active non-protein fraction of bovine hypothalamic extract (for preparation[4], lot No. HH_9) was further purified by high-voltage electrophoresis[5]. The zone containing the factor activating adenohypophysial acid phosphatases *in vitro* was eluted by 0.09% NaCl and the subfraction was labelled HH_{9+1}. 1 cm³ of the eluate of this active zone corresponded to 19 mg of the original non-protein fraction HH_9. The effect of the electrophoretically homogenous subfraction HH_{9+1} on TSH release by rat adenohypophyses was tested *in vitro*.

Female albino rats (descendants of the Wistar strain) acclimatized at 23 ± 1°C, fed standard Larsen diet and water *ad libitum*, were killed by decapitation and their adenohypophyses were removed. In each of three successive experiments, 10–13 pooled adenohypophyses were incubated for 1 h at 37 ± 0.1°C in two different media: A) 10 cm³ Krebs-Ringer-phosphate + 3 cm³ 0.09% NaCl; B) 10 cm³ Krebs-Ringer-phosphate + 3 cm³ subfraction HH_{9+1}. Both media contained 300 mg glucose/100 cm³. In both groups and all experiments 6.6 mg adenohypophysial tissue was incubated in 1 cm³ medium. After incubation the media were separated and frozen.

The amount of TSH in the media was estimated by the radio-iodine uptake method, described elsewhere[6]. Female albino Wistar rats weighing about 100 g were hypophysectomized by the parapharyngeal route under ether anaesthesia. Three days after hypophysectomy, administration of the test material was started; once daily every rat received one subcutaneous injection of 0.5 cm³. Four groups of rats were used:
(1) 16 hypophysectomized rats without any injection served as controls; (2) 14 hypophysectomized rats received four doses of 0.5 cm³ of the mixture of 10 cm³

[1] V. SCHREIBER, Acta univ. carol. med. (Prague), in press.
[2] V. SCHREIBER and V. KMENTOVÁ, Endokrinologie (Leipzig) *38*, 69 (1959).
[3] V. SCHREIBER, M. RYBÁK, and V. KMENTOVÁ, Exper. *16*, 466 (1960).
[4] V. SCHREIBER, M. RYBÁK, and V. KMENTOVÁ, Physiol. Bohemoslov. *9*, 303 (1960).
[5] V. SCHREIBER, J. KOČÍ, A. ECKERTOVÁ, and V. KMENTOVÁ, Physiol. Bohemoslov., in press.
[6] A. ECKERTOVÁ and Z. FRANC, Čsl. fysiologie (Prague) *10*, 48 (1961).

Group	1	2	3	4
Administered material	0	medium with fraction HH_{9+1}	medium after incubation of hypophyses without HH_{9+1}	medium after incubation of hypophyses with HH_{9+1}
Number of tests	16	14	14	15
Concentration of fraction $HH_9{}^+{}_1$ in the medium	—	1 cm³/3.3 cm³	0	1 cm³/3.3 cm³
Total dose of tested material in cm³	0	2	2	2
Mean weight of adenohypophyses incubated in 1 cm³ medium in mg	—	—	6.6	6.6
% of the dose of radio-iodine found in the thyroid gland. Means $\pm \sigma_m$	0.9 ± 0.10	1.3 ± 0.18	2.2 ± 0.33	5.1 ± 0.87 [a]

[a] Comparison of groups 3 and 4 by Fisher's t-test: $p < 0.01$

Krebs-Ringer-phosphate and 3 cm³ fraction HH_{9+1} (second control group); (3) 14 hypophysectomized rats received four doses of 0.5 cm³ of medium A (after incubation of the hypophyses without fraction HH_{9+1}); (4) 15 hypophysectomized rats received four doses of 0.5 cm³ of medium B (after incubation of the hypophyses with fraction HH_{9+1}).

1 h after the last injection 4 μC of carrier-free $Na^{131}I$ was administered to each rat subcutaneously. 24 h after the administration of radio-iodine, the rats were killed by ether anaesthesia, the thyroid glands were removed and their radioactivity was measured by Geiger-Müller counter. The activity of each thyroid was expressed as a percentage of the radio-iodine dose administered, a model of the rat thyroid containing 4 μC $Na^{131}I$ being used as the indicator of 100% accumulation.

The results are shown in the Table. The radio-iodine uptake in rats of group 2 was not statistically different from group 1, indicating that no TSH was present in fraction HH_{9+1}. After the administration of medium A (after incubation of the adenohypophyses without fraction HH_{9+1}), the radio-iodine uptake doubled, indicating some release of TSH into the medium. After the administration of medium B, a substantial elevation in thyroid radio-iodine uptake was registered, idincating an at least two-fold increase in TSH release into the medium in the presence of fraction HH_{9+1}. It appears, therefore, that fraction HH_{9+1} stimulated the release of TSH from rat adenohypophysial tissue *in vitro*. This is in agreement with our previous results on the effect of the original non-protein fraction HH_9 on TSH release from adenohypophysial autografts *in vivo*[3]. Further work is needed to prove the specificity of this reaction and to test whether only release or also the production of TSH is influenced.

Zusammenfassung. Die elektrophoretisch isolierte Fraktion des hypothalamischen Extraktes erhöht *in vitro* die Sekretion des thyreotropen Hormons aus der Adenohypophyse der Ratte in der Krebs-Phosphat-Ringerlösung mit 300 mg% Glukose. Die Fraktion selbst besitzt keine TSH-Wirkung.

V. Schreiber, A. Eckertová, Z. Franc, J. Kočí, M. Rybák, and V. Kmentová

Laboratory for Endocrinology and Metabolism, Faculty of General Medicine, Charles University, Prague; Research Institute for Pharmacy and Biochemistry, Prague; Institute of Haematology and Blood Transfusion, Prague (Czechoslovakia), February 10, 1961.

Influence of the Structure of the *N*-terminal Extremity of α-MSH on the Melanophore Stimulating Activity of this Hormone

We have formerly reported[1,2] the total synthesis of α-MSH[3,4]. When compared with natural hog α-MSH[5], our synthetic material has shown the same melanophore stimulating activity by both the *in vivo*[6] and the *in vitro*[7] assays[8,9], the same kinetics of degradation by chymotrypsin and by trypsin, and the same chromatographic and electrophoretic behaviour under a variety of conditions, thus definitely proving its complete identity with the natural product. We have also found that our synthetic product loses its biological activity under the action of hydrogen peroxyde and regains it almost completely by subsidiary treatment with cysteine or thioglycollic acid[10].

This successful synthesis of α-MSH opened the way for obtaining synthetic analogues of this hormone. By following a scheme of synthesis similar to that one we used for α-MSH, we have prepared the three structural analogues (A, B, and C) mentioned in the Table, in order to investigate the influence of the structure of the *N*-terminal extremity on the biological properties[11].

[1] R. A. Boissonnas and St. Guttmann, Abstracts of Communications of the 4th international Congress of Biochemistry (Vienna, 1–6 Sept. 1958). Abstracts Nr. 1–3 (Pergamon Press Ltd.).

[2] St. Guttmann and R. A. Boisonnas, Helv. chim. Acta *42*, 1257 (1959).

[3] A. B. Lerner and T. H. Lee, J. Amer. chem. Soc. *77*, 1066 (1955). – T. H. Lee and A. B. Lerner, J. biol. Chem. *221*, 943 (1956).

[4] J. I. Harris and A. B. Lerner, Nature *179*, 1346 (1957). – J. I. Harris, Biochem. J. *71*, 451 (1959).

[5] We are indebted to Dr. R. Guillemin and Dr. A. V. Schally (Baylor University, Houston) for a generous gift of pure natural α-MSH.

[6] F. W. Landgrebe and H. Waring, *Hormone Assay* (Academic Press 1950), p. 141.

[7] K. Shizume, A. B. Lerner, and T. B. Fitzpatrick, Endocrinology *54*, 553 (1954).

[8] The assays were kindly performed by Dr. Flückiger in our Pharmacological Department.

[9] We thank Dr. Guillemin for having kindly duplicated our assays in his own laboratory.

[10] H. B. F. Dixon, Biochim. biophys. Acta *19*, 392 (1956).

[11] A preliminary account of this work was given at the 17th International Congress of Pure and Applied Chemistry (August 20 to September 6, 1959, Munich), Abstract B 230, and at the 2nd European Peptide Symposium (September 6 to 9, 1959, Munich), Angew. Chemie *72*, 47 (1960).

Using the dicyclohexylcarbodiimide method[12], we condensed CBO-Ser-Tyr-Ser-Met-Glu(OBz)-OH[13,14] with H-His-Phe-Arg-Try-Gly-(ε-CBO)Lys-Pro-Val-NH_2[15] in acetonitrile/dimethylformamide 2:1 to CBO-Ser-Tyr-Ser-Met-Glu(OBz)-His-Phe-Arg-Try-Gly-(ε-CBO)Lys-Pro-Val-NH_2 (85% yield. M.p. 160°. Analysis calculated for $C_{98}H_{126}O_{22}N_{21}SCl$: C 58.3; H 6.3; O 17.5; N 14.6; S 1.6. Found: C 59.2; H 6.5; O 17.2; N 14.3; S 1.7. K = 15 in the system sec-butanol/trichloracetic acid/water 200:1:200. UV spectrum: λ_{max} = 282 mμ (log ε = 3.83), 292 mμ (log ε = 3.70). Amino acid composition: $Ser_{2.2}$ $Tyr_{1.0}$ $Met_{1.0}$ $Glu_{1.0}$ $His_{0.9}$ $Phe_{1.0}$ $Arg_{0.9}$ $Gly_{1.1}$ $Lys_{1.2}$ $Val_{1.1}$).

Scission of the protecting groups was accomplished by passing a current of dry hydrogen bromide into a solution of the protected tridecapeptide in trifluoroacetic acid/diethylphosphite/methylethylsulfide 4:1:1[2]. After purification by a countercurrent distribution of 381 transfers (K = 1.6) in the system sec-butanol/trifluoroacetic acid/water 200:1:200, H-Ser-Tyr-Ser-Met-Glu(OH)-His-Phe-Arg-Try-Gly-Lys-Pro-Val-NH_2 (= analogue A) was obtained in an homogeneous state (61% yield), as proved by paper chromatography[16] (Rf_M = 0.22. Rf_P = 0.10. Rf_A = 0.25) and paper electrophoresis[16]. ($E_{1.9}$ = 1.1 Glu = 1.4 Try = 0.7 His. $E_{5.8}$ = 0.8 His = 2.1 Try) after revelation by the ninhydrin, bromphenolblue, chlorine-starch-iodide, Folin and Sakaguchi reagents[17]. The tridecapeptide was entirely digested by leucine-aminopeptidase, giving the composing amino acids in the expected ratio. It exhibited 1/15 of the melanophore stimulating activity of α-MSH[8,9], but no unequivocal ACTH activity was detected either *in vitro*[9,18] or *in vivo*[9,19].

Condensation of CBO-Ser-N_3[20] with H-Met-Glu(OBz)-OH[13] afforded CBO-Ser-Met-Glu(OBz)-OH (49% yield. M.p. 116°. $[\alpha]_D^{20} = -11°$ (methanol), −25° (dimethylformamide). Analysis calculated for $C_{28}H_{35}O_9N_3S$: C 57.1; H 6.0; O 24.4; N 7.1; S 5.4. Found: C 57.3; H 5.9; O 24.7; N 6.9; S 5.5). This tripeptide was condensed with H-His-Phe-Arg-Try-Gly-(ε-CBO)Lys-Pro-Val-NH_2[15] by dicyclohexylcarbodiimide in acetonitrile/dimethylformamide 2:1 to CBO-Ser-Met-Glu(OBz)-His-Phe-Arg-Try-Gly-(ε-CBO)Lys-Pro-Val-NH_2 (72% yield. M.p. 178°. Analysis calculated for $C_{86}H_{112}O_{18}N_{19}SCl$: C 58.4; H 6.4; N 15.1; S 1.8. Found: C 58.7; H 6.5; N 15.0; S 1.8. $[\alpha]_D^{23} = -36°$ (methanol), −25° (dimethylformamide)).

Scission of the protecting group of a first portion of the protected endecapeptide was effected by passing a current of dry hydrogen bromide into a solution of this peptide in trifluoroacetic acetic/diethylphosphite/methylethylsulfide 4:1:1[2]. After purification by countercurrent distribution (K = 4.0) in the system sec-butanol/trichloracetic acid/water 200:1:200, H-Ser-Met-Glu(OH)-His-Phe-Arg-Try-Gly-Lys-Pro-Val-NH_2 (= analogue B) was obtained in a homogeneous state, as proved by paper electrophoresis ($E_{1.9}$ = 0.7 His = 1.1 Glu = 1.4 Try; $E_{5.8}$ = 0.7 His) after revelation by the ninhydrin, bromphenolblue, chlorine-starch-iodide, Folin and Sakaguchi reagents[17]. The endecapeptide exhibited a melanophore stimulating activity[8] amounting to only 1/100 of that of α-MSH and no unequivocal *in vitro* ACTH activity[18].

Scission of the protecting groups of a second portion of the protected endecapeptide was accomplished by passing a current of dry hydrogen bromide in a solution of this peptide in acetic acid/diethylphosphite/methylethylsulfide 4:1:1. Under these conditions an O-acetylation of the serine residue takes place[13]. After purification by countercurrent distribution (K = 5.2) in the system sec-butanol/trichloracetic acid/water 200:1:200, H-(AcO)Ser-Met-Glu(OH)-His-Phe-Arg-Try-Gly-Lys-Pro-Val-NH_2 was obtained in a homogeneous state, as proved by paper electrophoresis[16] ($E_{1.9}$ = 1.1 Glu; $E_{5.8}$ = 0.7 His) after revelation by the ninhydrin, chlorine-starch-iodide, Folin and Sakaguchi reagents[17]. The product was converted in the corresponding *N*-acetyl endecapeptide by a sojourn of 1 h at pH 7.9 ± 0.1. After purification by countercurrent distribution (K = 3,5) in the same system as above, Ac-Ser-Met-Glu(OH)-His-Phe-Arg-Try-Gly-Lys-Pro-Val-NH_2 (= analogue C) was obtained in an homogeneous state, as proved by paper electrophoresis[16] ($E_{1.9}$ = 1.0 Glu; $E_{5.8}$ = 0.5 His) after relevation by the ninhydrin, bromphenolblue, chlorine-starch-iodide, Folin and Sakaguchi reagents[17]. The acetylated tridecapeptide exhibited a melanophore stimulating activity[8] amounting to 1/4 of that of α-MSH.

Our experimental results show that the absence of the *N*-acetyl group on the *N*-terminal serine residue of α-MSH (analogue A) brings about a sharp decrease of the melanophore stimulating activity, as had been formerly predicted by Harris[21].

As expected, a further decrease of the melanophore stimulating activity results, when not only the acetyl group, but also the two first amino residues of the *N*-terminal extremity of the α-MSH chain are suppressed (analogue B). On the other hand, it is surprising that a

[12] J. C. Sheehan and G. P. Hess, J. Amer. chem. Soc. *77*, 1067 (1955).
[13] St. Guttmann and R. A. Boissonnas, Helv. chim. Acta *41*, 1852 (1958).
[14] CBO- = carbobenzyloxy-; Bz- = benzyl-; Ac- = acetyl. All the amino acids bearing an asymetric carbon are of the *L* configuration.
[15] R. A. Boisonnas, St. Guttmann, R. L. Huguenin, P. A. Jaquenoud, and Ed. Sandrin, Helv. chim. Acta *41*, 1867 (1958).
[16] Ascending paper chromatography on Schleicher and Schuell washed paper No. 2040b. Rf_M in methylethylcetone/pyridine/water 65:15:20. Rf_A in isoamylalcohol/pyridine/water 35:35:30. Rf_P in *n*-butanol/acetic acid/water 70:10:20. Paper electrophoresis under high tension (70 V/cm). $E_{1.9}$ at pH 1.9 in formic acid/acetic acid/water 15:10:75. $E_{5.8}$ at pH 5.8 in pyridine/acetic acid/water 9:1:90. $E_{1.9}$ = 1.1 Glu indicates that at pH 1.9 the compound migrates 1.1 time the distance run by glutamic acid.
[17] For the exact composition of the reagents see ref. [2].
[18] The assays were kindly performed by Dr. Zehnder of our Pharmacological Department.
[19] A similar observation was recently preliminary reported by K. Hofmann et al., J. Amer. chem. Soc. *83*, 487 (1961).
[20] J. S. Fruton, J. biol. Chem. *146*, 463 (1942).
[21] J. I. Harris, Symposium on Protein Structure (Methuen & Co., London 1958), p. 333. This conclusion is also in accordance with the recent observation by J.-P. Waller and B. F. Dixon, Biochem. J. *75*, 320 (1960), that the introduction of an *N*-acetyl group on the *N*-terminal serine residue of ACTH causes a five to ten times increase of the small inherent melanocyte stimulating activity of this hormone.

Influence of the structure of the *N*-terminal extremity on the melanophore stimulating activity

Chemical structure		Relative melanophore stimulating activity (in molar relation to α-MSH)
Ac-Ser-Tyr-Ser-Met-Glu(OH)-His-Phe-Arg-Try-Gly-Lys-Pro-Val-NH_2	(α-MSH)	*1*
H-Ser-Tyr-Ser-Met-Glu(OH)-His-Phe-Arg-Try-Gly-Lys-Pro-Val-NH_2	(analogue A)	1/15
H-Ser-Met-Glu(OH)-His-Phe-Arg-Try-Gly-Lys-Pro-Val-NH_2	(analogue B)	1/100
Ac-Ser-Met-Glu(OH)-His-Phe-Arg-Try-Gly-Lys-Pro-Val-NH_2	(analogue C)	1/4

simple acetylation of the *N*-terminal extremity of this only slightly active endecapeptide brings about a twenty five times increase of the melanophore stimulating activity (analogue C).

We see two possible explanations for this phenomenon: either the *N*-terminal structure of the chain has to be Ac-Ser- for the appearance of a strong melanophore stimulating activity, or the presence of an acetyl group at the extremity of the peptide chain ensures its resistance against degradation by aminopeptidases, thus increasing the apparent biological activity of the acetylated molecules by simply lenghtening their life.

Zusammenfassung. Drei strukturelle Analoge des α-MSH wurden synthetisiert und auf ihre Melanophoren-stimulierende Wirksamkeit untersucht. Für das Auftreten einer ausgeprägten biologischen Aktivität scheint die Anwesenheit einer *N*-Acetyl-Gruppe an dem Aminoende der Peptidkette wichtiger zu sein als das Vorhandensein der zwei ersten amino-endständigen Aminosäurereste der α-MSH-Kette.

St. Guttmann and R. A. Boissonnas

Department of Pharmaceutical Chemistry, Sandoz Ltd., Basel (Switzerland), April 4, 1961.

Studies on Inhibition of 3,4-Dihydrophenylethylamine (Dopamine) β-Oxidase *in vitro*[1]

The availability of a method for the preparation of purified dopamine β-oxidase[2] makes it possible to study the mechanism of the hydroxylation and the substrate specificity of the enzyme. The hydroxylation of the side chain of dopamine may be the rate-limiting step in the biosynthesis of norepinephrine and, consequently, inhibitors of dopamine hydroxylation may be important therapeutic agents in lowering norepinephrine levels *in vivo*.

This is a preliminary report of a study designed to explore the possibility of structural analogues of dopamine as well as structurally unrelated compounds being inhibitors of dopamine β-oxidase.

The test compounds were added simultaneously with 40 μg dopamine-1-C^{14} to a mixture which contained the following components (in μMol): potassium phosphate buffer, pH 6.4, 100; (1-methyl-2-phenyl)-ethyl hydrazine hydrochloride, 1.3; ascorbic acid, 6; fumaric acid, 10; ATP, 12.5. To this mixture 0.2 ml of the enzyme was added[3] and the final volume was adjusted with phosphate buffer pH 6.4 to 1 ml. The reaction mixture was incubated for 1 h at 37°C using air as a gas phase. At the end of the incubation the reaction was stopped by the addition of 3% acetic acid in ethanol, and the solution heated at 55°C for 5 min. The precipitate proteins were removed by centrifugation. The alcohol in the supernate was evaporated under nitrogen and the solution was analyzed for dopamine-1-C^{14} and norepinephrine-1-C^{14}. Dopamine-1-C^{14} and norepinephrine-1-C^{14} were separated as the acetylated derivatives by paper chromatography in the 'C' solvent system of Bush[4]. The relative inhibition rate of dopamine β-oxidase by each compound was determined by the comparison of the amount of norepinephrine-1-C^{14} formed in an incubation mixture which contained only the substrate and the incubation mixture which contained the compound to be tested and the substrate.

The accompanying Table shows the effects of the test compounds on the conversion of dopamine to norepinephrine. Several generalizations may be deduced from the Table. Primary phenylethylamines and phenylpropylamines are active inhibitors, while secondary amines are less active. Phenolic amines are even more potent inhibitors than phenyl amines, but methoxy amines are less active. The nature of the inhibition and the activity of the inhibitors *in vivo* are under investigation.

Added in proof: It was also found that homarylamine and impramine (Tofranil) are inhibitors of dopamine β-oxidase. We have also been able to show that phenylethylamine, 3-methoxydopamine, and *p*-hydroxyemphetamine are substrates of dopamine β-oxidase and are converted by it to the corresponding β-hydroxy compounds.

Zusammenfassung. Die enzymatische Umwandlung von Dopamin in Norepinephrine wird durch primäre Phenylethylamine und Phenylpropylamine sowie durch Pentobarbital gehemmt.

M. Goldstein and J. F. Contrera

Department of Psychiatry and Neurology, New York University, College of Medicine, New York, January 16, 1961.

[1] This work was supported by grants from the National Institutes of Health.

[2] E. Y. Levin et al., J. biol. Chem. *235*, 2080 (1960).

[3] The enzyme was prepared by the method of E. Y. Levin et al.[2] but the purification on calcium phosphate gel was omitted.

[4] M. Goldstein et al., Proc. Soc. exp. Biol. Med. *103*, 137 (1960).

Inhibition of dopamine-to-norepinephrine conversion *in vitro*

Active compounds	Amount added in μg	% of Inhibition	Inactive compounds	Amount added in μg	% of inhibition
p-hydroxyphenylethylamine	400	70–80	N-acetyl dopamine	400	0
β-phenylethylamine	400	40–50	3,4-dihydroxyphenylethylmethylamine	400	0–5
dl-d-methylphenethylamine (Amphetamine)	800	30–40	(Epinine)		
2-phenylcyclopropylamine (SKF-385)	800	30–40	3-methoxy-4-hydroxyphenylethylamine	400	0–5
Pentobarbital sodium	800	20–30	(3-methoxydopamine)		
3,4-dihydroxyphenylethylamine (Epinine)	800	10–20	3,4,5-trimethoxyphenylethylamine (Mescaline)	400	0
3-methoxy-4-hydroxyphenylethylamine	800	10–20	N,N-diethyl-*d*-lysergamide (LSD-25)	400	0
(3-methoxydopamine)			Phenylmethylaminopropane (*d*-Desoxyephedrine)	400	0–5

An Hypothesis for Oxidative Phosphorylation [1,2]

The myriad of obscure chemical processes whereby Pi eventually combines with ADP to yield ATP concomitant with the oxidation of reduced respiratory components such as diphosphopyridine nucleotide, flavoprotein and cytochrome have been encompassed by the term *oxidative phosphorylation*[3]. The observed P/O ratios have been idealized as 3, 2, and 1 and are related to the positions in the respiratory chain occupied by the starting reduced coenzyme and the final oxidizing agent[4]. The experimental data has frequently been summarized in a symbolic fashion as the intermediates are as yet unknown. In this paper a working hypothesis based on chemical principles will be proposed.

The 1, 4 addition of Pi (acting as a nucleophile) to an unsaturated carbonyl system, followed by dehydrogenation would yield the moiety $H_2O_3P\text{–}\overset{\frown}{O}\text{–}C{=}\overset{\frown}{C}\text{–}C{=}\overset{\frown}{O}$ in which phosphorus is susceptible to nucleophilic attack. Such susceptibility is a requisite for a phosphorylating agent[5]. This sequence is reminiscent of the 1, 2 addition of Pi to the carbonyl group followed by dehydrogenation which occurs in the transformation of 3-phosphoglyceraldehyde to the effective phosphorylating agent 1, 3-diphosphoglyceric acid[6].

The past[7] and current[8] emphasis on the participation of quinones in cellular respiration suggested the selection of the vinyl carbonyl system of a quinone to be part of the mechanism of oxidative phosphorylation. The mechanism (Fig.) has been orientated to start with DPNH, as is

[1] This investigation was supported by the grant of a Special Fellowship, Division of Medical Sciences; and partially supported by grant C-2399 National Cancer Institute, National Institutes of Health; Department of Health Education and Welfare.

[2] The abbreviations used are DPN diphosphopyridine nucleotide, DPNH reduced diphosphopyridine nucleotide, ATP Adenosine triphosphate, ADP Adenosine diphosphate, Pi orthophosphate, P/O ratio of atoms of phosphorous and oxygen coupled through oxidative phosphorylation, DNP 2,4-dinitrophenol, E enzyme.

[3] J. S. FRUTON and S. SIMMONDS, *General Biochemistry*, 2nd ed. (John Wiley and Sons Inc. 1958), p. 380.

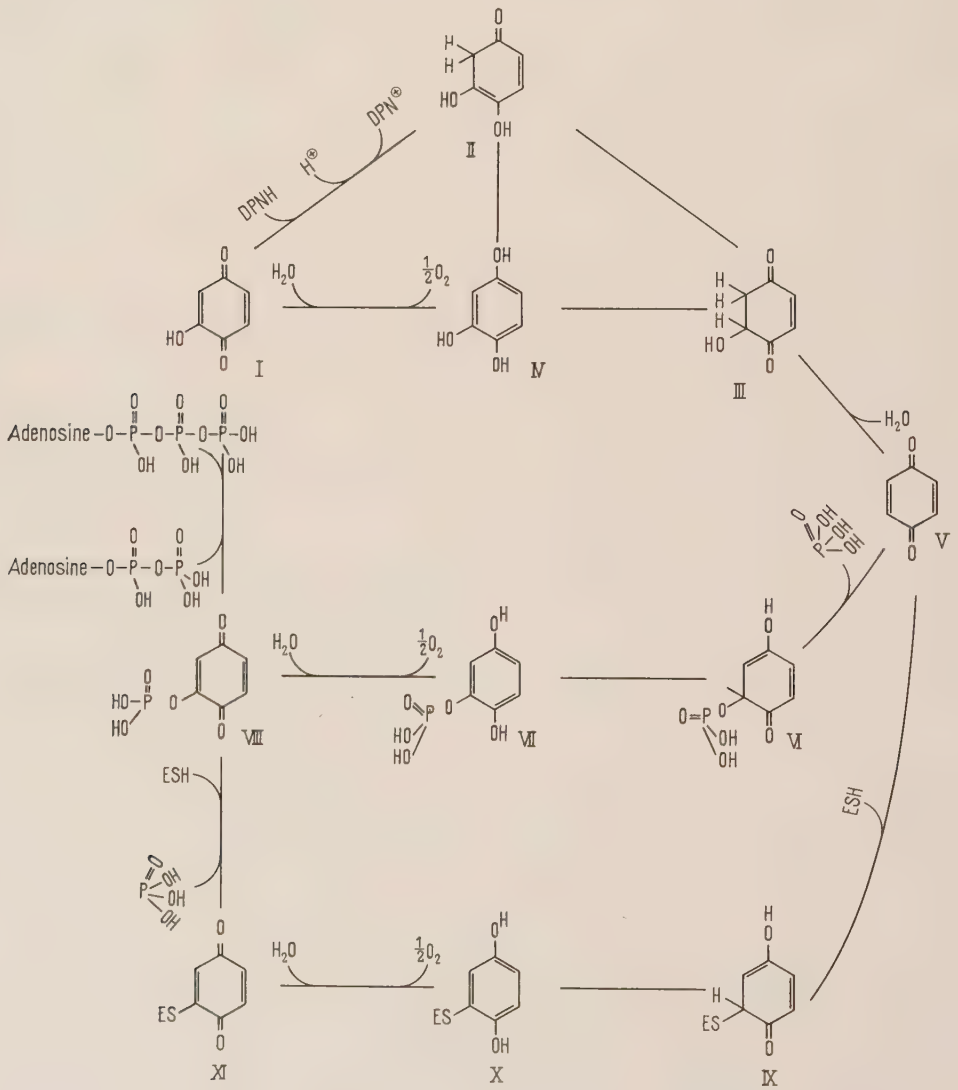
[4] Ref. [3], p. 383.

[5] A. TODD, Proc. Nat. Acad. Sci. Wash. *45*, 1389 (1959).

[6] Ref. [3], p. 325.

[7] L. F. FIESER and M. FIESER, *Organic Chemistry*, 3rd ed. (Reinhold Publishing Corporation, New York 1956), p. 722.

[8] For many of the references in this area see: A. F. BRODIE and J. BALLANTINE, J. biol. Chem. *235*, 232 (1960). – D. E. GREEN and R. L. LESTER, Fed. Proc. *18*, 987 (1959). – C. MARTIUS, *Ciba Foundation Symposium on the Regulation of Cell Metabolism* (J. O. Churchill, London), p. 194.



DPNH and $\frac{1}{2}O_2$ represent appropriate reduced and oxidized portions of the respiratory chain.

customary in such discussions. The rationalization will begin, however, with Pi acting as a nucleophile.

The transformation of V to VI is the recognized 1, 4 addition of an acid to a quinone[9]. The hydroquinone VII, a tautomer of VI, is then oxidized to the quinone VIII. In VIII phosphorus is susceptible to nucleophilic attack. This structure is analogous to known metabolic phosphorylating agents since VIII may be considered as either an enol phosphate or a mixed anhydride of phosphoric acid with a vinylogue of a carboxylic acid. The structure I is obtained as a consequence of the phosphorylation of ADP. As I converted to V (presumably through tautomers such as II and III) the hydroxyl group is eliminated by a sequence of reduction and dehydration. This type of reaction and tautomerism has recently been described and discussed[10–12]. Structures II and III are reasonable intermediates, since DPNH may be considered as the source of the hydride anion, which behaves as a nucleophile and participates in 1, 4 addition to I[13,14].

The hydroxyhydroquinone IV, which is tautomeric with II and III, is an alternative reduction product of I. Reoxidation of IV would yield I. The sequence I, II, III, V, VI, VII, VIII, I is a cyclic mechanism which accounts for oxidative phosphorylation with a P/O ratio of 1[15]. The sequence I, II or III, IV, I involves oxygen uptake without concomitant uptake of Pi. The enhanced formation of the tautomer IV from II or III could account for the uncoupling of oxidative phosphorylation by an agent such as DNP[16]. In view of the participation of enzyme sulphhydryl groups during the conversion of 3-phosphoglyceraldehyde to 1,3-diphosphoglyceric acid[17] the transformation of V to VIII may be mediated through IX, X, and XI rather than through VI and VII.

The nature and degree of substituents and number of aromatic rings markedly influence: (a) the oxidation-reduction potential of a quinone[18], (b) the keto-enol tautomerism of a hydroxyhydroquinone[12], (c) the ease of the reductive elimination of a hydroxyl group from a hydroxyquinone[12]. The existence of semiquinones[19] permit the various oxidation-reduction steps outlined in the Figure to take place either through a single two electron transfer or through a sequence of two transfers, each of one electron. Thus appropriate quinones may mesh with various oxidation-reduction processes in the respiratory chain including those involving free radicles[20,21].

Some striking agreement with the hypothesis may be found in the experimental literature. Cohen[22] and Boyer[23] demonstrated that an oxygen atom from Pi ended up in water during oxidative phosphorylation. In the proposed scheme ADP is a nucleophile acting on VIII, hence one of the oxygen atoms derived from Pi remains with 1 and ends up in water. Boyer's symbolism[23] which summarizes much data, may be related to the above structures as follows: Y is V, $YOPO_3^=$ is VII, $Y'O \sim PO_3^=$ is VIII, Y'OH is I. Boyer also reasoned 'if DNP acts by preventing the initial phosphate uptake then its action is in some manner to allow dissipation of the energy of oxidation prior to formation of a compound or state that otherwise would react with Pi'. The proposal that DNP facilitates the conversion of II or III to IV conforms with this view. The formation of V is consistent with the data which Pinchot[24] obtained with a bacterial particulate system. Subsequent to the action of DPNH Pinchot found a soluble acceptor of Pi whose acceptor activity was not diminished by DNP. The inclusion of DNP during the treatment with DPNH yielded variable amounts of the phosphate acceptor. The inhibition of electron transport by the lack of ADP and Pi is in agreement with the hypothesis[25]. The isolation from natural sources of the 1,4-diketo tautomer of 1,4,5-trihydroxy-7-methylnaphthalene[26–28] supports the significance ascribed to tautomerism in the hypothetical scheme.

The mechanism, suggests the search for quinones and vinyl carbonyl compounds unsubstituted in a distal vinyl position. In view of the lability of substituents on a quinone nucleus, especially under oxidizing conditions[29,30], this mechanism, with suitable modification, may be used to rationalize the mode of action of substituted quinones e.g. coenzyme Q_{10} and compounds such as vitamins K and E and dicoumarol. The isolation of hydroxyquinones from organisms with the capacity for rapid metabolism e.g., parasitic fungi, seeds and eggs[31] and also as a metabolite from a carcinogenic polynuclear hydrocarbon[32] is of cogent interest.

Résumé. Présentation d'une hypothèse pour la phosphorylation oxidative qui comprend des substances vinyl carbonyl, suivie d'une esquisse d'un système cyclique utilisant des quinones, hydroxyquinones, hydroxy-hydroquinones et leurs dérivés phosphorilatés.

H. I. Hadler[33]

Institute for Enzyme Research, University of Wisconsin, Madison, December 27, 1960.

[9] Ref. [7], p. 716.

[10] D. B. Bruce and R. H. Thompson, J. chem. Soc. *1952*, 2759.

[11] D. B. Bruce and R. H. Thompson, J. chem. Soc. *1954*, 1428.

[12] R. H. Thompson, Quart. Rev. *10*, 27 (1956).

[13] H. F. Fisher, E. E. Conn, B. Vennesland, and F. H. Westheimer, J. biol. Chem. *202*, 687 (1953).

[14] H. C. Deno, H. J. Peterson, and G. S. Saines, Chem. Rev. *60*, 7 (1960).

[15] DPNH and $^1/_2$ O_2 represent appropriate reduced and oxidized portions of the respiratory chain.

[16] Ref. [3], p. 385.

[17] P. D. Boyer, in P. D. Boyer, H. Lardy, and K. Myrback, Ed., *The Enzymes*, 2nd ed. (Academic Press Inc., New York 1959), p. 577.

[18] Ref. [7], p. 712.

[19] G. W. Wheland, *Advanced Organic Chemistry*, 2nd ed. (John Wiley and Sons Inc., New York 1948), p. 725.

[20] H. Bienert, J. biol. Chem. *225*, 465 (1957).

[21] V. Massey, J. biol. Chem. *235*, PC47 (1960).

[22] M. Cohen, J. biol. Chem. *201*, 735 (1953).

[23] Proceedings of the International Symposium on Enzyme Chemistry, Tokyo and Kyoto (1957); Maruzen Tokyo (1958) article by P. D. Boyer, p. 301.

[24] G. B. Pinchot, Proc. Nat. Acad. Sci. Wash. *46*, 929 (1960).

[25] H. A. Lardy and H. Wellman, J. biol. Chem. *195*, 215 (1952).

[26] R. G. Cook, H. Dowd, and L. J. Webb, Nature *169*, 974 (1952).

[27] R. G. Cook, H. Dowd, and L. J. Webb, Austr. J. Sci. Res. *5*, 760 (1952).

[28] R. G. Cook, H. Dowd, and L. J. Webb, Austr. J. Chem. *6*, 53 (1953).

[29] B. O. Linn, N. R. Trenner, B. H. Arinson, R. G. Weston, C. H. Shunk, and K. Folkers, J. Amer. chem. Soc. *82*, 1647 (1960).

[30] V. L. Frampton, W. A. Skinner, P. Carnbour, and P. S. Bailey, J. Amer. chem. Soc. *82*, 4632 (1960).

[31] R. H. Thompson, *Naturally Occurring Quinones* (Academic Press Inc., New York 1957).

[32] C. Heidelberger, H. I. Hadler, and G. Wolf, J. Amer. chem. Soc. *75*, 1303 (1953).

[33] *Acknowledgement:* Thanks are due Dr. H. A. Lardy for his enthusiastic support, Dr. W. W. Cleland for his interest, and Mr. L. R. Gignilliat III for his counsel.

Effects of Hypophysectomy and Thyroidectomy on the Glycogen Depletion in Livers of Rats Treated with Thioacetamide

Hepatotoxic agents, when given to rats, produce changes in liver glycogen storage, which are more conspicuously observed around the central veins[1–3]. Thioacetamide (TA) is one of these agents.

Fifteen days after the beginning of the treatment, no glycogen can be demonstrated in the centrolobular area, while in the periportal zone the parenchymal cells keep their normal amount of glycogen (Fig. 2).

This regular and geometrical pattern of glycogen distribution in the TA-treated animals is maintained, until bile-duct proliferation and fibrosis disrupt the normal parenchymal architecture and alter the dynamic relationship existent between the different areas of the liver lobule. Although it is impossible at present to indicate how the glycogen mobilization is involved in the carcinogenic process, it seems that this change plays some rôle in the sequence of events which result in liver damage, cirrhosis and possibly tumors, as pointed out by SPAIN et al.[1]. This view being supported by the observation that glycogen depletion follows the administration of ethionine, thioacetamide, carbon tetrachloride, DAB and 3-Me-DAB, all of which show cirrhogenic and tumorigenic activity in the liver.

It is a well-established fact that chronic terminal lesions (cirrhosis and tumor) induced in the liver of rats by a series of drugs are influenced by the animal's hormonal imbalance. Hypophysectomy[4], thyroidectomy[5] and adrenalectomy[6] inhibit or delay cirrhosis and tumor formation in rats treated with 3-Me-DAB, acethylaminofluorene or aminofluorene and *p*-dimethylaminofluorene.

We report here the preliminary results of an investigation on the effects of changes in hormonal inbalance upon the early glycogen mobilization induced by thioacetamide in the liver of rats.

1 J. D. SPAIN and A. C. GRIFFIN, Cancer Res. *17*, 200 (1957).
2 K. R. PORTER and C. BRUNI, Cancer Res. *19*, 997 (1959).
3 J. W. ORR, D. E. PRICE, and L. H. STICKLAND, J. Path. Bact. *60*, 573 (1948).
4 A. C. GRIFFIN, A. P. RINFRET, and V. F. CORSIGLIA, Cancer Res. *13*, 77 (1953).
5 F. BIELSCHOWSKY and W. H. HALL, Proc. Univ. Otago Med. Sch. *30*, 26 (1952).
6 A. SYMEONIDIS, A. S. MULAY, and F. H. BURGOYNE, J. Nat. Cancer Inst. *14*, 805 (1954).

Fig. 1. Normal liver. P.A.S. method. 80×.

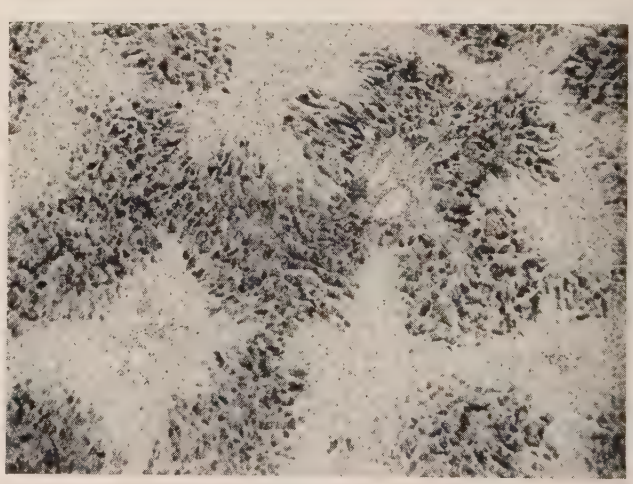


Fig. 2. Intact rat liver. TA-treated. P.A.S. method. 80×.

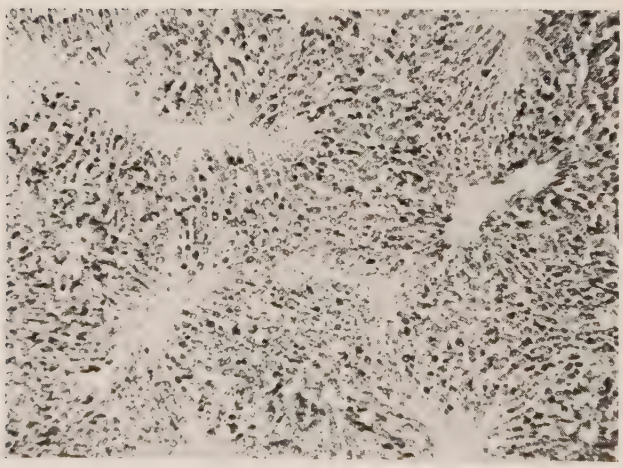


Fig. 3. Hypophysectomized rat liver. TA-treated. P.A.S. method. 80×.

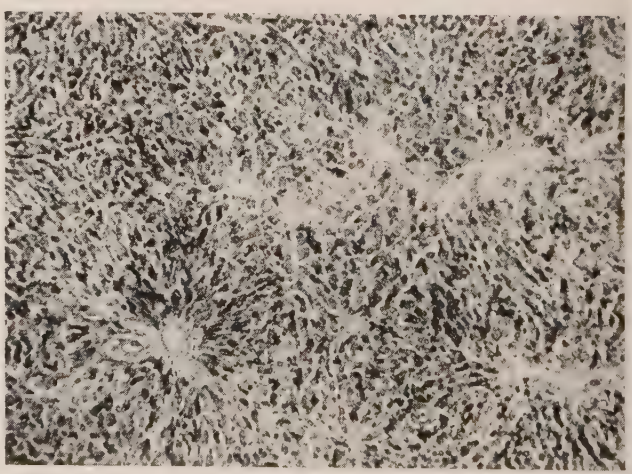


Fig. 4. Thyroidectomized rat liver. TA-treated. P.A.S. method. 80×.

Hypophysectomized and thyroidectomized male rats of the inbred August strain, weighing 200 g were treated for 15 days with daily injections of thioacetamide (10 mg/100 g of body weight). The animals were then killed and their livers removed for histological examination. Intact control animals were also treated as above and examined within the same period.

Figure 1 shows the uniform distribution of glycogen in the liver parenchyma of a normal, well fed rat. Figure 2 shows the typical glycogen distribution pattern in a TA-treated liver of an intact animal. There is complete disappearance of glycogen from the parenchymal cells around the central veins.

Hypophysectomized (Fig.3) or thyroidectomized (Fig.4) rats, when treated with TA for 15 days, failed to show centrolobular glycogen depletion.

These histological observations clearly indicate that changes in the animal hormonal imbalance influence not only the terminal stages of drug-induced liver lesions, as has been demonstrated by others, but also prevent the early manifestations of the treatment, like centrolobular glycogen depletion.

The fact that thyroidectomy alone can suppress the TA-glycogen effect seems to indicate that thyroxin is the key hormone involved in the complex mechanism responsible for such effect. Further investigations will attempt to clarify this point.

Zusammenfassung. Die Verarmung von Glykogen in der Leber als Ausdruck der toxischen Wirkung von Thioacetamid kann durch Hypophysektomie oder Thyroidektomie verhindert werden.

J. P. Guimarães and M. C. Santos Mota

Divisão de Patologia, Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro (Brazil), January 30, 1961.

Leucine Aminopeptidase in the Foetal Kidney of the Rat

Leucine aminopeptidase is a widely distributed enzyme, taking part in protein degradation and perhaps also in synthesis. Its existence in large amounts in the kidney of numerous animal species has long been described. Histochemically it was localized by Nachlas et al.[1] (1957) using *L*-leucyl-2-naphtylamide, and later (1960) using *L*-leucyl-4-methoxy-2-naphthylamide as substrate[2].

Leucine aminopeptidase of the adult rat kidney is noted to be most active in the juxtamedullary portion of the cortex, while the outer cortical zone is less active and the medulla is negative. The presence and distribution of leucine aminopeptidase in the foetal kidney of the rat had not been studied and was the object of the present investigation. The enzyme was demonstrated by the method of Nachlas et al. as published in 1957. Altogether 30 kidneys of foetal and young rats were studied.

Figure 1 shows a section from the kidney of an 18-day embryo, the incubation time being 10 min. The cortex is still narrow and almost completely without enzymatic activity. Here and there, near the juxtamedullary portion, however, some groups of the tubuli have a faint enzymatic activity. Figure 2 shows a section from the kidney of a small rat, 4 days after delivery. Its enzymatic activity is clearly very much greater and localized over the greatest part of the narrow cortex. To make a comparison possible, Figure 3 shows a section from the kidney of a 2 months old rat after a similar staining procedure. It shows a high activity in the juxtamedullary part of the cortex and some staining also in the outer tubular portions of the cortex. The white spots represent the localization of the glomerula.

[1] M. M. Nachlas, D. T. Crawford, and A. M. Seligman, J. Histochem. *5*, 264 (1957).

[2] M. M. Nachlas, B. Monis, D. Rosenblatt, and A. M. Seligman, J. biophysic. biochem. Cytol. *7*, 261 (1960).

Fig. 1

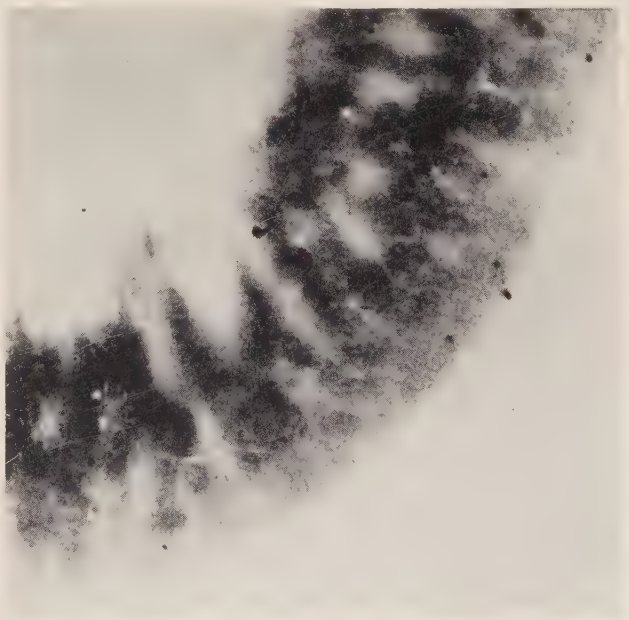


Fig. 2

These Figures show that the activity of leucine aminopeptidase in the kidney is very small during the foetal period of life. Further, they show that the occurence of leucine aminopeptidase happens regionally so that some few single, widely distributed tubular groups first show a moderate enzymatic activity, while the other parts of the cortex and the medulla still are fully negative. A high increase in the enzymatic activity occurs after delivery.

The observations made are interesting from the point of view of the foetal function of the kidney. Numerous investigations have shown that the function of the foetal kidney begins at a very early stage of pregnancy. One of the functions of the kidney during foetal life is supposed to be to participate in producing foetal fluid[3]. Our figures could be interpreted to show that in a rather late stage of pregnancy only very few single nefrons are capable of functioning where the presence of leucine aminopeptidase is needed and are thus competent for full function from this point of view. The tubuli of these nefrons are also shown to contain the enzyme in very low concentration, which may indicate that the function of these nefrons also cannot be intense.

The activity of leucine aminopeptidase increased soon after delivery, which is in good agreement with the earlier observations that the functional capacity of the kidney increases very intensely during the first days after delivery.

Fig. 3

Zusammenfassung. Histochemisch demonstrierbare Leucinaminopeptidase erschien in den letzten Tagen der Schwangerschaft in einzelnen Gruppen von Tubuli der Rinde der fötalen Rattenniere. Der grösste Teil der Rinde und das Mark erwiesen sich als negativ. Nach der Geburt verbreitete sich das Ferment über die ganze Rinde und vermehrte seine Aktivität stark.

V. K. HOPSU, S. RUPONEN, and S. TALANTI

Department of Anatomy, University of Turku (Finland), January 24, 1961.

[3] R. E. SHAW and H. J. MARRIOT, J. Obstetr. Gynaec. *56*, 1004 (1949).

Increased Serum Diphenylamine Reaction in Patients with Leukemia

Normal human serum contains a variety of carbohydrate-reacting material some of which is tightly bound to peptide and protein to form the so-called mucosaccharide fraction. This mucosaccharide fraction can be estimated by a number of colorimetric reactions based on the sugar component; a comprehensive list of these reactions is given by BYWATERS and GLYNN[1]. In particular, the diphenylamine reaction[2] has often been used for obtaining an overall value of the level of mucosaccharides in serum[3–6].

Previous work on the diphenylamine reaction of human serum has shown that there is a considerable increase in the reacting component in the serum of patients with various types of malignant disease, acute rheumatoid arthritis and tuberculosis. Although NIAZI and STATE[4] included a considerable variety of malignant conditions in their study they did not differentiate between the conditions in listing the results; all their malignancy values were grouped together under one heading. Their investigation included one leukemic patient. We thought it worth while to study leukemia in more detail in this connection when serum from leukemic patients was made available to us by the courtesy of Dr. PRANKERD and of the Radiotherapy Department, U.C.H. Since this work was started a value for the *N*-acetyl neuraminic acid content of leukemic serum has been published[7] although as yet no details of the method used etc. are available to us.

Procedure. 5 ml of blood were mixed with 0.2 ml of 5% versene and then centrifuged to remove all cellular elements. 0.5 ml of the resulting serum[8] were heated for 15 min at 90° with 9.5 ml of 5% trichloroacetic acid. After cooling the mixture was filtered and the extract was used for estimating the mucosaccharide component as follows:

2 ml extract were boiled for 1 h with 4 ml of diphenylamine reagent[2] (1 g diphenylamine in 98 ml glacial pure acetic acid and 2 ml pure concentrated sulphuric acid). After cooling the absorption spectrum was determined using a Unicam-SP-500 spectrophotometer; the region covered was 360–700 mμ and the tubes were always read against a heated trichloroacetic acid blank boiled for the same period of time.

In agreement with earlier work[4], it was found that the cold TCA-soluble fraction of serum gave little absorption at 530 mμ on boiling with diphenylamine reagent. This indicates that the majority of the material producing the peak at 530 mμ is bound to protein and is extracted by hot TCA. Figure 1 shows the absorption spectra obtained by boiling hot TCA extracts of red blood cells, leucocytes and serum with diphenylamine reagent for 1 h. It can be seen that only the serum extract shows a marked 530 mμ peak.

[1] E. G. L. BYWATERS and L. E. GLYNN, in *Biochemical Disorders in Human Disease* (Ed. R. H. S. THOMPSON and E. J. KING, J. & A. Churchill Ltd., 1957), p. 634.

[2] Z. DISCHE, in *The Nucleic Acids* (Ed. E. CHARGAFF and J. N. DAVIDSON, Academic Press Inc., New York 1955), Vol. 1.

[3] N. W. PIRIE, Brit. J. exp. Path. *17*, 269 (1936).

[4] S. NIAZI and D. STATE, Cancer Res. *8*, 653 (1948).

[5] W. AYALA, L. V. MOORE, and E. L. HESS, J. clin. Invest. *30*, 781 (1951).

[6] A. F. COBURN, L. V. MOORE, and J. HANINGER, Arch. int. Med. *92*, 185 (1953). – G. R. FEARNLEY, J. PIRKIS, N. DE COEK, R. LACKNER, and R. I. MEANOCK, Ann. Rheum. Dis. *14*, 226 (1955). – E. CECCHI and F. FERRARIS, Ann. Rheum. Dis. *14*, 267 (1955).

[7] P. BÖHM (1958) quoted by A. Gottschalk, in *The Chemistry and Biology of the Sialic Acids* (Cambridge University Press 1960), p. 93.

[8] In accordance with common practice this fraction is referred to as serum although the blood had been prevented from clotting. The sialic acid content of fibrin (and haemoglobin) is negligible compared to the serum level[7].

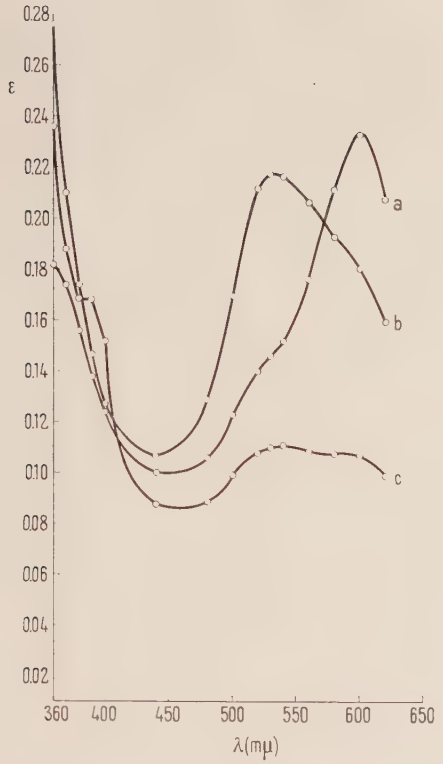


Fig. 1. Absorption spectra obtained after boiling hot trichloroacetic acid extracts of blood fractions with diphenylamine reagent for 1 h. Curve a, using an extract of leucocytes; curve b, plasma; curve c, red cells.

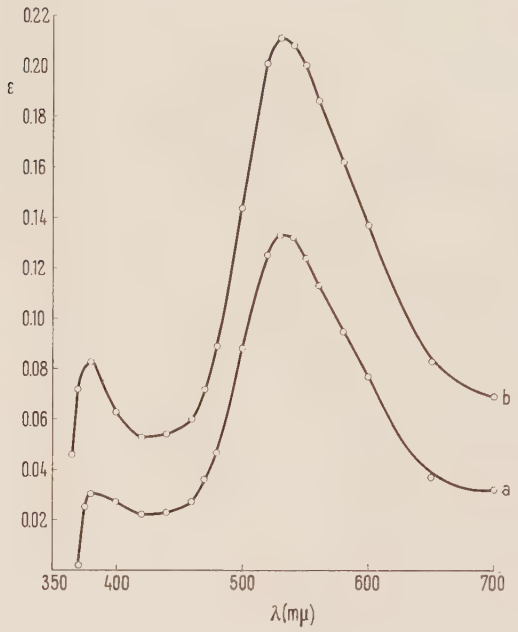


Fig. 2. Absorption spectra obtained by boiling hot trichloroacetic acid extracts of normal (a) and leukemic serum (b) with diphenylamine reagent under the conditions described in the text.

Figure 2 shows the spectrum obtained with a leukemic sample (case No. 2) and with a normal serum sample. It can be seen that there is no qualitative difference between the two spectra, both showing a marked peak at 530 mμ and a rise in absorption below 400 mμ. The 360–400 mμ region proved one of great variability, some samples showing a small peak at about 380 mμ as in Figure 2, and others a rapidly rising absorption as in Figure 1. This variation probably results from a number of factors: free glucose produces considerable absorption in this region, and sialic acid yields a secondary peak at 380 mμ.

The Table gives the readings obtained at 530 mμ with leukemic and normal sera. We have included in the Table a case of myeloid metaplasia and two cases of Hodgkins disease, one in the acute phase and the other quiescent. It can be seen that the mean value for the leukemic samples is considerably higher than that obtained with normal samples. The difference between the two mean values is statistically significant. The magnitude of the diphenylamine reaction in the two Hodgkins diseases paralleled the gravity of the condition; in the single case of myeloid metaplasia the value obtained was within the normal serum limits. Our results are therefore in agreement with the previously mentioned work of Böhm[7] on the rise in the sialic acid content of serum in leukemia, and the generalised malignancy findings of Niazi and State[4].

It is of interest to bear in mind that in most instances where an elevation of the diphenylamine reaction occurs there is also an increase in the erythrocyte sedimentation rate. Recent work[9] on the cell wall composition and

Diphenylamine reaction in normal and leukemic serum. Values are given in terms of *N*-acetyl-neuraminic acid as mg/100 ml serum. The conditions, both for the serum samples and for the calibration curve with *N*-acetyl-neuraminic acid, were as described in the text.

Case	Age	Diagnosis	White cell count ($\times 10^{-3}$)	mg/100 ml serum
1. Mrs. C.	62	chronic myeloid	240	78
2. Mr. E.	36	acute monocytic	116	96
3. Mr. S.	68	chronic lymphatic	72	93
4. Mr. A.	65	chronic myeloid	44	115
5. Mrs. W.	63	acute myeloid	32	128
6. Mr. R.	67	chronic lymphatic	109	106
7. Mr. W.	23	acute lymphoblastic	3.5	198
8. Mr. S.	58	chronic myeloid	12	72
9. Mr. F.	27	acute Hodgkins	6.8	190
10. Mr. C.	35	quiescent Hodgkins	6	107
11. Mrs. S.	68	myeloid metaplasia	3.5	61
		mean value[a] of cases 1– 8		111 ± 14
12.–19. Normals		mean value[a] of cases 12–19		61 ± 2

[a] ± standard error of the mean

[9] G. M. W. Cook, D. H. Heard, and G. V. F. Seaman, Nature (Lond.) *188*, 1011 (1960).

agglutination reactions of red cells have stressed the role of sialic acid. An increase in the serum level of similar substances might therefore alter the sedimentation rate not only by affecting the physical properties of the serum itself but by actual combination with like structures on the erythrocyte membrane.

Riassunto. Gli autori riscontrano nel siero di pazienti leucemici un aumento della reazione con difenilamina rispetto al siero di soggetti normali. Questo aumento è discusso alla luce di precedenti risultati che collegano questa reazione con i mucosaccaridi del siero.

T. F. SLATER and D. LOVELL[10]

Department of Chemical Pathology and the Medical Unit, University College Hospital Medical School, London (England), February 9, 1961.

[10] We thank the British Empire Cancer Campaign for an award to one of us (D.L.), and are grateful to Professor C. RIMINGTON for helpful comments on the manuscript. The *N*-acetyl-neuraminic acid used for the calibration curve was very kindly supplied by Miss CARROLL of The Medical Research Council, Mill Hill.

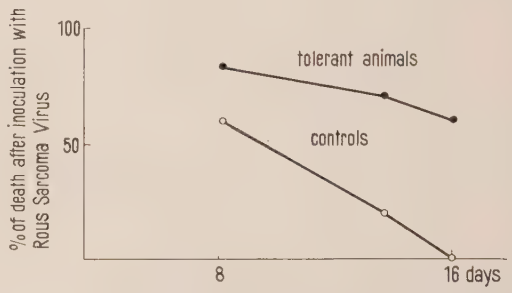
Immunological Tolerance to Rous Sarcoma Virus in Ducks

We have succeeded[1] in eliciting immunological tolerance to Rous sarcoma virus in ducks, just as it was produced in turkeys[2,3]. Intraembryonic or better repeated post-embryonic injections of chicken blood or lyophilized blood were used for the induction of tolerance. A comparison of susceptibility to Rous virus in control and tolerant ducks of different ages is shown in the Figure. The distribution of both curves suggests that although the differences in susceptibility of the two groups are apparent on the 8th day, 16 day-old control birds are resistant, whereas tolerant ducks succumb in more than 50% to inoculation with cell-free filtrates from Rous sarcoma. (Extracts were prepared by homogenization of 20% suspension of chicken Rous sarcoma tissue (stored in frozen state) in isotonic potassium citrate at pH 7, by centrifugation for 20 min at 8000 *g* and by filtration of supernatant through procelain candles 'Selas 02'.) The state of tolerance depends on repeated administration of antigen during the adaptive period. A single injection of 0.3 ml of chicken blood on the first day after hatching is capable of eliciting a weak degree of tolerance (10%), whereas the same dose divided into 3 injections administered on the first, third, and fifth day induces a clear-cut tolerance (30%). The same dependance was found to exist with the dose of 0.9 ml. The postnatal period during which it is possible to induce tolerance in ducks is relatively long—injections of chicken blood commenced on the 14th day after hatching are still fully effective whereas those commenced later are ineffective[4]. Nuclear nucleoproteid appeared to be a highly effective chicken antigenic material for induction of tolerance to Rous virus, whereas the desoxyribonucleic acid itself was ineffective[5].

The original explanation of tolerance to Rous virus, indicating that this is the tolerance displayed directly to the Rous virus particle, which therefore contains normal chicken antigens, is in conflict with more recent information concerning the nature of Rous virus. This is firstly, because it has been found that the Rous virus does not contain normal chicken antigens as an integral part of its functional surface[6], that it penetrates into the cell[7] much earlier than actively acquired immunity could play a role and that the presence itself of virus-neutralizing antibodies does not profoundly affect the tumour growth[8].

Secondly, our results given in the Table also show that virus-neutralizing capacity of sera from tolerant animals bearing large tumours does not differ from sera of resistant control animals, although in case of direct tolerance to the virus particle it must have been lower. Similar results obtained PRINCE[3] in tolerant turkeys.

All the results obtained with tolerance to Rous virus in ducks, as well as those obtained in turkeys[3,9] are in agree-



● ○ each point represents percentage of death in a group of 8 to 10 animals.

Natural susceptibility and actively acquired tolerance to Rous sarcoma Virus in ducklings of different ages.

Tests for virus-neutralizing capacity of sera from tolerant and control ducklings (tests were made on 10 day-old Leghorn chicks)

ID 50% after incubation of sera from tolerant animals with Rous virus	ID 50% after incubation of sera from control animals with Rous virus
$10^{2,66}$	$10^{-2,5}$
$10^{-2,5}$	$10^{-2,33}$
$10^{-2,5}$	$10^{-2,16}$
$10^{-2,7}$	$10^{-2,54}$
$10^{-2,33}$	$10^{-3,0}$
$10^{-3,16}$	$10^{-3,23}$

[1] J. SVOBODA, Folia biol. (Praha) *4*, 205 (1958).
[2] M. SIMONSEN, Nature *175*, 763 (1955). – R. J. C. HARRIS, Proc. Roy. Soc., B, *146*, 59 (1956). – J. SVOBODA and M. HAŠEK, Folia biol. (Praha) *2*, 256 (1956). – R. J. C. HARRIS, J. chron. Dis. *8*, 58 (1958). – R. J. C. HARRIS and P. J. SIMONS, Nature *181*, 1485 (1958).
[3] A. M. PRINCE, Personal communication (1960).
[4] J. SVOBODA, Folia biol. (Praha) *6*, 21 (1960).
[5] J. SVOBODA, Folia biol. (Praha) *6*, 96 (1960).
[6] H. RUBIN, Virology *2*, 545 (1956). – T. BORSOS, J. Nat. Cancer Inst. *20*, 1215 (1958). – M. RYCHLÍKOVÁ and J. SVOBODA, Virology *10*, 545 (1960).
[7] H. TEMIN and H. RUBIN, Virology *6*, 669 (1958).
[8] P. VIGIER, Bull. du Cancer *45*, 460 (1958).
[9] J. HORT, J. SVOBODA, and M. HAŠEK, Folia biol. (Praha) *6*, 371 (1960).

ment with DULBECCO's suggestion[10] that the Rous virus – simultaneously with the malignant transformation of foreign cell – is capable of inducing the formation of some chicken antigenic complex in this cell by a process which might be analogous to the transduction or better conversion in phages[11]. In this connection, the finding of GUSYEV[12] is of great importance, namely that the Rous virus induces the formation of specific non-virus antigen, even in chicken cells, and that it produces the morphological conversion of chicken fibroblasts[13].

These foreign tumour cells containing some chicken antigens may exhibit progressive growth only in hosts which are immunologically not fully mature or are tolerant to chicken antigens, because, in normal animals which are immunologically mature, they are destroyed like all cells of antigenically foreign tissues by immunological reaction.

The present interpretation is in agreement with our previous findings[1] that in control ducks, after inoculation with Rous virus, palpable tumours occur which regress in contrast to those in tolerant animals. The difference between the two groups is not manifest until in the reaction to virus-induced tumour cells.

Résumé. Tolérance immunologique au virus du sarcome de Rous chez les canards. Les résultats obtenus ont été interprétés comme suit: Le virus de Rous par l'action maligne sur les cellules d'autres espèces y provoque la formation d'un complexe antigénique de poulet et rend ces cellules capables d'une croissance progressive, chez les animaux qui tolèrent les antigènes de poulet.

J. SVOBODA

Department of experimental Biology and Genetics, Czechoslovak Academy of Sciences, Prague (Czechoslovakia), January 27, 1961.

[10] R. DULBECCO, in *Symposium on Latency and Masking in Viral and Rickettsial Infections* (Ed. D. L. WALKER, R. P. HANSON, A. S. EVANS, published by Burgess Publishing Co., Minneapolis), p. 46.
[11] H. UETAKE, S. E. LURIA, and J. W. BURROUS, Virology *5*, 68 (1958).
[12] A. I. GUSYEV, Byull. Eksptl. Biol. Med. *47*, 70 (1960).
[13] H. TEMIN, Virology *10*, 182 (1960).

PRO EXPERIMENTIS

Benützung der oszillographischen Polarographie in der Mikrobiologie

Im folgenden sind einige Möglichkeiten der analytischen Ausnützung der oszillographischen Polarographie mit Wechselstrom[1] für den Nachweis der Utilisation und des Metabolismus einiger Aminosäuren und der Bestandteile der Nucleinsäuren bei *Escherichia coli* entwickelt. Es wurde das «Polaroskop P-524» (Fa. Křižík, Prag) mit Quecksilber-Tropfenelektrode benützt, welches die zeitliche Änderung der Spannung $dE/dt = f_1(E)$ demonstriert (Fig. 1).

Mit Hilfe dieser Apparatur wurde der Einfluss gewaschener bakterieller Zellsuspensionen und auch wachsender Kulturen von *E. coli* auf einige Aminosäuren und Bestandteile der Nucleinsäuren in vollsynthetischen flüssigen Nährböden erforscht (Tab.). Die analysierten Substrate wurden in gepufferten (Michaelis m/15 Phosphatpuffer) physiologischen Lösungen verschiedener pH-werte gelöst und mit der *E. coli*-Kultur beimpft oder aber mit 1% der gewaschenen Zellen von *E. coli* gemischt. Nach 1–24 h Inkubation bei 37°C wurden die bakteriellen Kulturen und Zellsuspensionen in verschiedenen Grundelektrolyten oszillographisch analysiert[2,3] (Tab.).

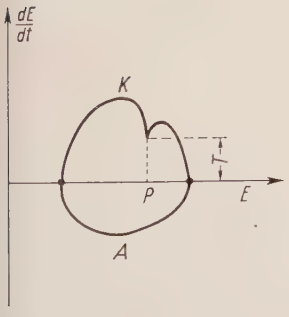


Fig. 1. Oszillogramm $dE/dt = f_1(E)$. Die Qualität der analysierten Stoffe ist durch das Potential des Einschnittes (P) charakterisiert (das gewissermassen mit dem polarographischen Halbstufenpotential analog ist) und die Quantität durch die Tiefe (T) des Einschnittes. (K) kathodischer Zweig, (A) anodischer Zweig.

Aktivitätsbestimmungen der bakteriellen Asparaginase[4], der Nucleodesaminasen[5,6] sowie der Phosphorylasen der Pyrimidinnucleosiden[7,8] sind vorgenommen worden. Es ergaben sich zahlreiche Möglichkeiten für die praktische Ausnützung der Oszillopolarographie in der Mikrobiologie: a) vor allem die Geschwindigkeit der Manipulation; b) relative experimentelle Einfachheit der Oszillographie; c) gleichzeitige Orientierung über Ernährungsprozesse und Metabolismus der Mikroorganismen; d) Applikation auf dem Gebiete der mikrobiologischen Enzymo-

Substrat	Grundelektrolyt (1 Mol) NaOH	H_2SO_4	$HCOONH_4$/HCOOH
Asparagin	+		
Glutaminsäure	+		
Adenin		+	
Guanin			+
Adenosin		+	
Desoxyadenosin		+	
Guanosin			+
Adenylsäure		+	
Desoxyadenylsäure		+	
Guanylsäure			+
Desoxyguanylsäure			+
Cytidin		+	
Cytidylsäure		+	
Thymin	+		
Uridin	+		

[1] J. HEYROVSKÝ und R. KALVODA, *Oszillographische Polarographie mit Wechselstrom* (Akad. Verlag, Berlin 1960).
[2] D. KALÁB, Pharmazie *10*, 31 (1955).
[3] E. PALEČEK, Naturwiss. *45*, 186 (1958).
[4] D. KALÁB, (Vortrag) I. Tschechoslowakisches oszillopolarographisches Symposium in Smolenitza, April 1960.
[5] C. LUTWAK-MANN, Biochem. J. *30*, 1495 (1936).
[6] R. J. MANS und A. L. KOCH, J. biol. Chem. *235*, 450 (1960).
[7] L. M. PAEGE und F. SCHLENK, Arch. Biochem. *28*, 348 (1950).
[8] L. M. PAEGE und F. SCHLENK, Arch. Biochem. Biophys. *40*, 42 (1952).

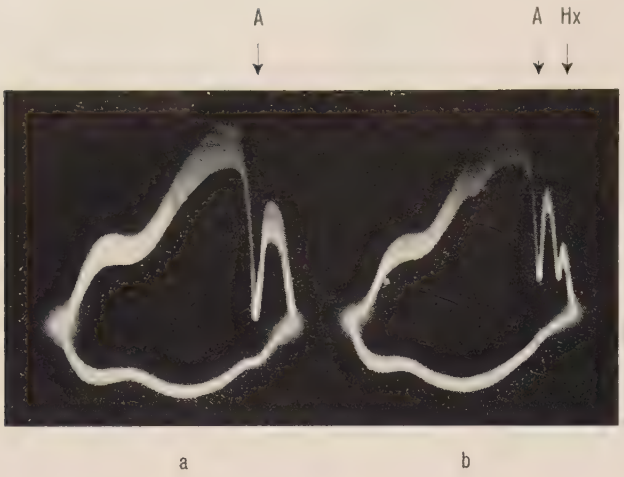


Fig. 2. Photographische Aufnahmen der Oszillogramme. a) Adenin (0,01 %) in Nährlösung (der Einschnitt –A–); b) Hypoxanthin aus Adenin in 20 h. Kultur von *Escherichia coli* (der Einschnitt –Hx–).

logie; e) praktische Ausnützung der Analysen in der technischen Mikrobiologie. Die Oszillopolarographie der Bestandteile der Nucleinsäuren hat den Vorzug sowohl vor der klassischen Polarographie[3] und laufend benützten Spektrophotometrie als auch vor der zeitlich langsameren Papierchromatographie (Fig. 2a, b).

Summary. Oscillographic polarography with alternating current was used for following the course of utilisation and metabolism of some amino acids, purine and pyrimidine bases, similarly as their nucleosides and nucleotides in the washed suspensions of resting cells and in growing cultures of *Escherichia coli*. The 'Polaroscope P-524' was used with mercury dropping electrode. The method was described for the oscillopolarographic investigation of activity of some bacterial enzymes, as for example: asparaginase, some nucleodesaminases and enzymes involved in the cleavage of nucleosides.

D. KALÁB

Bioveta, Ivanovice (Forschungsstelle) na Hané (Tschechoslowakei), 15. Februar 1961.

STUDIORUM PROGRESSUS

Untersuchungen über den Fettstoffwechsel bei Ratten. (Kombinierte akute und chronische Fettüberfütterung bei normaler bzw. atherogener Grundkost)

Einleitung

Bei der zunehmenden Bedeutung der Abnützungskrankheiten des Gefäßsystems ist das Studium aller mit dem Fettstoffwechsel in Zusammenhang stehenden Probleme stark in den Vordergrund getreten. Sein enger Zusammenhang mit der Atheromatose ist unbestritten, wenn auch in steigendem Masse deutlich wird, dass ganz verschiedenartige pathogenetische Faktoren bei ihrer Entstehung mitwirken. Es ist zweifellos ebenso unrichtig, in der Gefässwanderkrankung nur eine Störung im Cholesterin- oder Phosphorlipoidstoffwechsel zu sehen, wie es auch nicht zutreffen kann, dass die Fettsäuren des Blutes in ihrer qualitativen und quantitativen Zusammensetzung, ihrem Sättigungsgrad, dem Anteil an reinen Fettsäuren bzw. ihren Estern mit Glycerin, Cholesterin oder Phosphatiden allein für das Ausmass der Gefässwanddegeneration verantwortlich zu machen sind. Über die pathogenetische Bedeutung einer Störung im Gleichgewicht von Fibrinbildung und Fibrinolyse, also einer Störung im komplexen Mechanismus der Blutkoagulation für die Atheroskleroseentstehung, für die neue Anhaltspunkte beigebracht wurden, lässt sich heute auch nur aussagen, dass sie wohl einen Teilfaktor, kaum aber die ausschliessliche Ursache darstellen kann. Die menschliche Atheromatose ist für experimentelle Untersuchungen ein schlechtes Objekt. Die verfügbaren klinischen, nicht bioptischen Teste sind vieldeutig und quantitativ kaum auswertbar, Blut- und Plasmaanalysen geben zwangsläufig ein einseitiges Bild, da nur die kreisenden gelösten Stoffe, nicht aber die in der Gefässwand eingelagerten Substanzen bzw. das Ausmass der Wandveränderungen erfasst werden, und da wir über die wechselseitigen Austauschvorgänge nichts erfahren. So bleiben wir hauptsächlich auf den Tierversuch angewiesen, ein wesentliches Hindernis, weil auf wenigen Gebieten der experimentellen Biologie so grosse artspezifische Eigenheiten und Unterschiede vorhanden sind, weshalb bei Übertragung der Befunde auf die Verhältnisse beim Menschen grösste Zurückhaltung notwendig ist. Die spontane Arteriosklerose alter Hennen beispielsweise, die weitgehend reversibler Natur ist und offenbar der Abnahme der Östrogenproduktion parallel geht, liefert ein ganz andersartiges Studienobjekt als etwa die durchaus unphysiologische Atheromatose beim Kaninchen nach massiver Cholesterinüberfütterung oder die Gefässwandveränderungen, die nach eigentlicher Fettmast (mit sehr hohem Fettgehalt des Futters) bei Ratten zur Beobachtung kommen.

Versuchsanordnung und Methoden

In den vorliegenden Versuchen haben wir uns die Aufgabe gestellt, das Stoffwechselverhalten von Ratten zu untersuchen, die chronisch mit verschiedenen Fetten überfüttert wurden. Wir verwendeten dazu Jungratten verschiedener Provenienz, ergänzend wurden auch einige Bestimmungen an hyperlipämischen Kaninchen vorgenommen. Bei gesunden Tieren beschränkten wir uns auf die Untersuchung der Blutwerte; die histologische Kontrolle erfolgte nur bei den Tiergruppen, bei denen durch Vorbehandlung Arteriosklerose- bzw. Atheromatose-artige Veränderungen erzeugt worden waren. Das für jeden Einzelversuch eingesetzte Rattenkollektiv betrug 80–100 Tiere im Anfangsgewicht von 120–180 g. Es wurden vorwiegend männliche Tiere verwendet. Da für die Analysen grössere Blutmengen erforderlich waren, wurde das Blut von jeweils 8–10 Tieren gepoolt. Dem Standardfutter (Futterwürfel der Nafag AG, Gossau) wurden je 10% Schweineschmalz bzw. Leinöl bzw. Rahm zugesetzt. Dabei schien es zweckmässig, die chronische Fettüberfütterung noch mit einer akuten Fettbelastung zu kombinieren, und zwar in dem Sinne, dass die unbehandelten Kontrollen und die fettgefütterten Tiere am Untersuchungstag eine einmalige grössere Fettmenge erhielten.

Den Angaben von CONSTANTINIDES et al.[1] folgend, wurden hierfür 3 cm³/kg Maisöl mit der Schlundsonde verabreicht. Tötung der Tiere 120 min nach der Maisölgabe. In einigen Versuchen wurde das Maisöl durch Olivenöl ersetzt. Folgende Methoden kamen zur Anwendung:

Ketonkörper nach GREENBERG und LESTER[2]; Brenztraubensäure nach MARKEES[3]; Blutzucker nach HAGEDORN-JENSEN; Gesamtfettsäuren nach DE KAMER[4]; Gesamtlipide nach BLOOR[5]; Polyenfettsäuren nach HERB und RIEMENSCHNEIDER[6]; beide Methoden nach den modifizierten Angaben von SCHRADE et al.[7].

Versuchsergebnisse

a) *Normale Ratten*[8]. 1. Die erhaltenen Werte bei Verwendung der Teste: Blutketonkörper, Blutbrenztraubensäure und Blutzucker zeigten bei unregelmässiger Streuung in den Gruppen der fettüberfütterten Ratten im Vergleich zu normal ernährten Kontrollen keinerlei signifikante Unterschiede. Wir hatten erwartet, zumindest bei den Produkten der β-Oxydation eine dem gesteigerten Fettumsatz entsprechende Erhöhung der Blutwerte zu finden. Ihr Fehlen erlaubt unseres Erachtens den Schluss, dass der gesunde Rattenorganismus imstande ist, auch grosse tägliche Nahrungsfettmengen (Schweineschmalz, Rahm, Leinöl), ebenso wie die akute zusätzliche Maisölbelastung, ohne Auftreten einer Ketose intermediär umzusetzen. Auch der Blutgehalt an Brenztraubensäure, die als direktes Abbauprodukt der Kohlenhydrate und als Schlüsselsubstanz zum Krebszyklus einen Hinweis auf einen gestörten «turn-over» auch für den intermediären Fettumsatz abgeben kann, zeigte nur unregelmässige Schwankungen. Das Gleiche gilt für das Verhalten des Blutzuckerspiegels. Wir haben deshalb die drei genannten Teste als ungeeignet zur Erfassung von Fettstoffwechselreaktionen in unserer Versuchsanordnung aufgegeben. Eine tabellarische Zusammenstellung der an grossem Material (etwa 400 Tiere) gewonnenen Einzelresultate kann weggelassen werden, da sie keine über das Gesagte hinausgehenden wesentlichen Aufschlüsse bringt.

2. Zu auswertbaren Resultaten führte die Bestimmung der Gesamtlipide bzw. der Gesamtfettsäuren und der Polyenfettsäuren im Blutserum bei gesunden Ratten, über die im folgenden zuerst berichtet werden soll:

Unter Beibehaltung der gleichen Versuchsanordnung mit chronischer Fettüberfütterung (Schweineschmalz bzw. Leinöl bzw. Rahm), kombiniert mit akuter Maisölbelastung, haben wir die in Tabelle I und II eingetragenen Werte ermittelt. Es sind die Mittelwerte aus vier bis sechs Einzelbestimmungen angegeben, die oft erhebliche Streuung ist berücksichtigt. Die Daten beziehen sich auf ein Versuchsmaterial von 500 mit Schweineschmalz, 200 mit Rahm und 300 mit Leinöl belasteten Tieren. Im Fütterungsversuch mit Schweineschmalz (Tab. I) zeigen die *Gesamtfette* vor und nach Maisölbelastung gegenüber den Kontrollen keine wesentliche Verschiebung, und zwar sowohl bei der Bestimmung nach 20 als auch nach 40 Tagen.

[1] P. CONSTANTINIDES, A. CAIRUS und A. WERNER, Arch. int. Pharmacodyn. *99*, 334 (1954).
[2] L. A. GREENBERG und D. LESTER, J. biol. Chem. *134*, 177 (1944).
[3] S. MARKEES, Exper. *11*, 205 (1955).
[4] J. H. DE KAMER, Med. Chemie Hindsberg, Lang *III*, 421 (1951).
[5] W. R. BLOOR, K. F. PELKAN und P. M. ALLEN, J. biol. Chem. *52*, 201 (1922).
[6] S. F. HERB und R. W. RIEMENSCHNEIDER, Analyt. Chem. *25*, 953 (1953).
[7] W. SCHRADE, R. BIEGLER und C. OH, Klin. Wschr. *34*, 1242 (1956).
[8] Für Tiermaterial und Arbeitsplatz, die uns für einen Teil dieser Versuche durch Herrn Prof. BERNHARD, Physiologisch-chemisches Institut der Universität Basel, zur Verfügung gestellt wurden, möchte ich auch an dieser Stelle meinen herzlichsten Dank aussprechen.

Tab. I. Kombinierte Fettbelastung bei *normalen* Ratten. Chronische Zulage von 10% *Schweineschmalz* zum Futter, akute Sondenfütterung mit 3 cm³/kg Maisöl. Gesamtfett und Gesamtfettsäuren in mg%; 2–4fach ungesättigte Polyenfettsäuren in % des Gesamtfettwertes. Werte jeweils vor und 120 min nach der Maisölgabe.

Zeit	Kontrolle (Normalfutter)					10% Schweineschmalz (im Normalfutter)				
	Gesamtfett mg%	Fettsäuren mg%	Polyenfettsäuren in % 2fach	3fach	4fach	Gesamtfett mg%	Fettsäuren mg%	Polyenfettsäuren in % 2fach	3fach	4fach
Ausgangswert *vor* Belastung	408	147	5,8	2,3	5,5					
Ausgangswert *nach* Belastung (Maisöl)	486	190	11,3	2,3	4,2					
Nach 20 Tagen *vor* Belastung	397	156	5,6	2,6	4,9	363	138	7,1	1,3	4,8
Nach 20 Tagen *nach* Belastung (Maisöl)	601	260	11,5	2,8	3,8	568	271	12,7	2,6	3,3

Tab. II. Kombinierte Fettbelastung bei *normalen* Ratten. Chronische Zulage von 10% *Leinöl* zum Futter, akute Sondenfütterung mit Maisöl 3 cm³/kg Tiergewicht. Gesamtfett und Gesamtfettsäuren in mg%; 2–4fach ungesättigte Polyenfettsäuren in % des Gesamtfettes. Werte jeweils vor und 120 min nach der Maisölgabe.

Zeit	Kontrolle (Normalfutter)					10% Schweineschmalz (im Normalfutter)				
	Gesamtfett mg%	Fettsäuren mg%	Polyenfettsäuren in % 2fach	3fach	4fach	Gesamtfett mg%	Fettsäuren mg%	Polyenfettsäuren in % 2fach	3fach	4fach
Ausgangswert *vor* Belastung	379	179	5,4	2,8	5,8					
Ausgangswert *nach* Belastung (Maisöl)	562	215	11,4	2,7	4,7					
Nach 20 Tagen *vor* Belastung	397	142	6,4	2,4	5,3	301	135	9,3	7,0	5,0
Nach 20 Tagen *nach* Belastung (Maisöl)	635	235	13,6	3,1	4,4	398	214	12,4	5,0	3,0

In der Tabelle fehlen die Werte für die 40tägige Bestimmung, da wir diese nur in den ersten Versuchen vorgenommen, später weggelassen haben, nachdem sich gezeigt hatte, dass die Werte keine wesentlichen Unterschiede gegenüber den Werten nach 20 Tagen ergaben.

Im Gegensatz zu den Befunden mit Schweineschmalz liegen die Absolutwerte in den Leinölversuchen (Tab. II) für die Gesamtfette niedriger als in den Kontrollen und die Differenzen zwischen Ausgangswert vor und Wert nach Maisölbelastung ist signifikant kleiner. Die einzelnen Grossversuche wurden zu verschiedenen Jahreszeiten und in gewissen Zeitabständen wiederholt, das Ergebnis fiel einheitlich gleich aus.

Der Unterschied in der Stoffwechselreaktion der Ratte auf gesättigte bzw. ungesättigte Fette scheint uns wesentlich. Der normale Rattenorganismus ist offensichtlich fähig, sich einer langdauernden, reichlichen Zufuhr eines vorwiegend gesättigten Fettes so anzupassen, dass keine verzögerte intermediäre Abbaugeschwindigkeit entsteht. Dies beweisen das unveränderte Niveau des Fettspiegels im Blut und der fehlende Mehranstieg der Gesamtfettwerte nach der Maisölbelastung im chronischen Fütterungsversuch mit Schweineschmalz gegenüber den Kontrollen. Im Unterschied dazu führt die chronische Belastung mit dem an ungesättigter Linolsäure reichen Leinöl zu einer deutlichen Verminderung des Gesamtfettgehaltes, und wir beobachten, wohl als Zeichen der Umsatzbeschleunigung, einen geringeren Anstieg nach der akuten Maisölbelastung.

Die Betrachtung der Durchschnittswerte für die *Polyenfettsäuren*, die in Prozenten der Gesamtfette angegeben werden, ergibt ebenfalls wichtige Aufschlüsse. Im Vergleich zu den Kontrollen liegen im Schweineschmalzversuch die Werte für die 2fach ungesättigte Linolsäure vor der Maisölbelastung eindeutig höher. Die Maisölbedingten Anstiege erfolgen nach 20 bzw. 40 Tagen in etwa gleicher Proportion wie bei den nicht fettüberfütterten Tieren. Bei der 3fach ungesättigten Linolensäure war kein einheitliches Verhalten zu beobachten, die Absolutwerte liegen beträchtlich niedriger als bei Linolsäure, der Schwankungsbereich hielt sich stets niedrig. Ganz regelmässig fielen in allen Versuchen die Werte für die 4fach ungesättigte Arachidonsäure nach der Maisölbelastung ab.

In den Leinölversuchen liegt das Ausgangsniveau für die 2- und 3fach ungesättigten Fettsäuren regelmässig hoch, was sich zwanglos aus dem hohen Gehalt an Polyenen im chronisch zugefütterten Fett erklären lässt. Die Maisölbelastung führt zu einem eher kleinen Linolsäureanstieg, während die Arachidonsäure wiederum regelmässig absinkt. Zu erwähnen bleibt hier noch der Ausfall der Fütterungsversuche mit Rahm. Wir haben ihre tabellarische Wiedergabe weggelassen, da sie prinzipiell genau das gleiche Resultat ergeben haben wie die mit Schweineschmalzbelastung. Der Organismus bewältigt die Rahmzufütterung von 10% ohne Zeichen der Fettstauung, der Linolsäurespiegel erfährt eine Steigerung, die Reaktion von Gesamtlipoiden und Polyenen auf die akute Fettbelastung erfolgt in typischer Weise.

Als wesentlich möchten wir für das geschilderte Verhalten der Polyenfettsäuren festhalten, dass chronische Überfütterung sowohl mit gesättigten als auch mit ungesättigten Fetten zu einer Steigerung der Polyenfettsäuren des Blutes, speziell der Linolsäure führt, und dass es zu einer Verschiebung im Verhältnis der einzelnen ungesättigten Verbindungen zueinander kommt. Von besonderer Bedeutung scheint uns dabei die Abnahme des Sättigungsgrades (regelmässige Verminderung der Arachidonsäure) als Folge der akuten Maisölbelastung. Um dem Einwand zu begegnen, die Wahl von Maisöl zur akuten Fettbelastung sei darum ungeeignet, weil dieses selbst als stark ungesättigtes Öl mit hohem Linolsäuregehalt zwangsläufig die Polyensäurewerte des Blutes verändere, haben wir einige Kontrollversuche mit Olivenöl durchgeführt. Das von uns verwendete Maisöl enthielt 28–34% Linolsäure gegenüber dem Olivenöl mit 2–4%, den gleichen Wert, den wir für Schweineschmalz fanden. Die Wirkung der akuten Olivenölbelastung (3 cm^3/kg) war nur hinsichtlich der Höhe des Linolsäureanstieges, der erwartungsgemäss kleiner ausfiel, unterschieden vom Maisöleffekt. Gesamtfette und Fettsäuren erfuhren die gleiche Vermehrung durch die Ölzufuhr, die Arachidonsäure nahm in analoger Weise ab.

b) *Ratten mit experimentellen Arteriosklerose- bzw. Atheromatose-artigen Veränderungen.* Die bisher beschriebenen Versuche wurden mit normalen Ratten angestellt. Im folgenden soll über die Resultate berichtet werden, die unter gleichen allgemeinen Versuchsbedingungen an Ratten mit experimenteller Mediasklerose und ernährungsbedingter Lipoidose gewonnen wurden[9]. Zur Erzeugung einer Mediasklerose erhielten die Tiere entsprechend den Angaben von LOUSTALOT et al.[10] in einer Vorperiode 10 Tage lang je 5 mg/kg Calciferol + Parathormon 0,25 cm^3/Tier. Zur diätetischen Lipoidoseerzeugung wurden die Tiere 28 Tage auf einer Protein- und Cholesterinreichen Diät (Diät I) bzw. Stärke- und Cholesterin-reichen, Protein-armen Kost (Diät II) gehalten und dann der chronischen Verfütterung mit Schweineschmalz sowie der akuten Maisölbelastung unterzogen. Bezüglich der genauen Zusammensetzung von Diät I und II siehe bei LOUSTALOT[11]. In Tabelle III haben wir 2 Versuche an mit Calciferol-Parathormon vorbehandelten Tieren zusammengefasst. Es sind die Werte für jeden Einzelversuch jeweils in den einzelnen Rubriken untereinander eingesetzt. Es ergeben sich bei grosser Streuung der Absolutwerte folgende Gemeinsamkeiten:

1. Der Gesamtlipidgehalt ist zu Versuchsbeginn deutlich erhöht im Vergleich zu den Normaltieren.

2. Nach Ablauf von 20 Tagen ist dieser Wert wieder zur Norm abgefallen.

3. Die Linolsäurewerte liegen anfänglich auffällig hoch und verändern sich durch die erste Maisölbelastung einmal geringfügig, einmal gar nicht.

4. Die Werte für die Linolsäure nach 20tägiger Schweineschmalzbelastung zeigen keine wesentlichen Abweichungen von den Zahlen bei gesunden Tieren.

Im ganzen betrachtet fällt auf, dass die Reaktion der Gesamtfette und der Linolsäure im Gefolge der Calciferol-Parathormon-Vorbehandlung eine gewisse reaktive Starre aufweist, die sich nur langsam zurückbildet. Das Verhalten der Arachidonsäure ist nicht einheitlich, zeigt sowohl den oben beschriebenen Abfall nach der Maisölbelastung als auch einen Anstieg. Besonders eindrücklich war der Ablauf in einem Versuch, dessen Daten wir nicht in die Tabelle aufgenommen haben. Hier kam es nämlich 20 Tage nach Versuchsbeginn (das heisst nach Abschluss der Calciferolvorbehandlung) zu einer weiteren gewaltigen Steigerung des Gesamtfettwertes (von 720 auf 2407 mg%) und gleichzeitig zum fast vollständigen Verschwinden der Linolsäure (von 12,0 auf 0,3%) aus dem Blut. Der Grad der Mediasklerose war in diesem Versuch nicht ausgeprägter als bei den andern Calciferolversuchen. Sehr auffällig war auch die Reaktion der mit Schweineschmalz über-

[9] Für die Vorbereitung und Überlassung der zu diesen Versuchen benötigten sowie für eine grosse Anzahl normaler Tiere bin ich der Ciba zu grossem Dank verpflichtet.

[10] P. LOUSTALOT, W. SCHULER und W. ALBRECHT, im Druck.

[11] P. LOUSTALOT, Helv. physiol. pharmacol. Acta *18*, 343 (1960).

fütterten Gruppe in diesem Versuch: Die Gesamtfette lagen hier mit 1210 mg% ebenfalls sehr hoch, wenn auch nur noch halb so hoch wie bei den Kontrollen (trotz der Fettzufuhr)! Der Linolsäurespiegel lag mit 2,2% ebenfalls sehr niedrig, reagierte dann aber normal auf die Maisölbelastung (Anstieg auf 6,6%). Es ist bestimmt unzulässig, aus diesem in unseren Versuchen bisher einmalig gebliebenen totalen Zusammenbruch der Fettstoffwechselregulation allgemeingültige Schlüsse zu ziehen. Immerhin scheint uns der Hinweis auf den möglichen kausalen Zusammenhang zwischen progressiver Hyperlipidämie und nahezu totalem Schwund der quantitativ wichtigsten Polyensäure bei einer Tiergruppe mit Calciferol-bedingter Mediasklerose gerechtfertigt.

Bei Verfütterung von Diät I (Protein- und Cholesterinreiche Kost) beobachteten wir ebenfalls eine hochgradige Steigerung der Gesamtlipoide, die durch den Maisölstoss noch beträchtlich zunahm. Das Nativserum war meist stark lipämisch. Die wesentliche Ursache der Hyperlipidämie besteht im Cholesterinüberschuss in der Diät I. Über die Durchschnittswerte von drei Versuchen orientiert Tabelle IV (wieder unter Angabe der untereinander eingesetzten Einzelwerte); in einer besonderen Rubrik sind, soweit mitbestimmt, die Cholesterinwerte angegeben. Die unter c in der Tabelle aufgeführten Zahlen entsprechen einem Versuch mit Protein-reicher Kost ohne Cholesterinzusatz.

Folgende Einzelheiten im Versuchsergebnis sind für die Polyensäuren hervorzuheben: Unmittelbar nach Abschluss der Diätvorbehandlung ändern sich in den Versuchen mit Cholesterin-reicher Diät I die eher niedrigen Linolsäurewerte als Folge der Maisölbelastung nur geringfügig bei gleichzeitiger starker Zunahme der Gesamtlipoide, die sehr tiefen Arachidonsäurewerte fallen geringfügig ab. Nach 20 Tagen ist die Hyperlipidämie verschwunden, die Linolsäure ist mässig, die Arachidonsäure stark angestiegen. Die Maisölbelastung bedingt jedoch nur eine geringe Zunahme der Linolsäure und beide Male ein weiteres Ansteigen der Arachidonsäure. Im Zusatzversuch mit Schweineschmalz finden wir ein ganz unregelmässiges Verhalten der Polyenfettsäuren und der Gesamtfettwerte. Der dritte Versuch mit Cholesterin-freier Diät I ist durch eine anfänglich mässige Steigerung der Gesamtfettwerte und Abfallen zur Norm nach 20 Tagen, durch unregelmässiges Verhalten der Linolsäure, hohe Arachidonsäureanfangswerte und Fehlen der Normalisierung des Polyensäureverhaltens durch die Schweineschmalzzufütterung gekennzeichnet.

Tab. III. Kombinierte Fettbelastung bei Ratten, die mit *Calciferol-Parathormon* vorbehandelt wurden. Chronische Zulage von *10% Schweineschmalz*, akute Sondenfütterung mit Maisöl, 3 cm³/kg Tiergewicht. Gesamtfett und Gesamtfettsäuren in mg%; 2–4fach ungesättigte Polyenfettsäuren in % des Gesamtfettes. Werte jeweils vor und 120 min nach der Maisölgabe.

Zeit	Kontrolle (Calciferol)					10% Schweineschmalz (im Normalfutter)				
	Gesamtfett mg%	Fettsäuren mg%	Polyenfettsäuren in % 2fach	3fach	4fach	Gesamtfett mg%	Fettsäuren mg%	Polyenfettsäuren in % 2fach	3fach	4fach
Ausgangswert *vor* Belastung	877	291	14,0	1,8	4,4					
	783	290	13,5	1,5	4,7					
Ausgangswert *nach* Belastung (Maisöl)	850	379	14,2	2,0	4,7					
	1113	553	16,3	0,0	2,6					
Nach 20 Tagen *vor* Belastung	580	256	5,8	1,7	4,1	325	285	4,6	2,4	4,4
	496	171	9,5	2,4	2,9	506	257	8,6	2,4	4,6
Nach 20 Tagen *nach* Belastung (Maisöl)	610	314	8,0	2,3	3,7	640	385	9,1	1,4	4,2
	566	371	11,0	2,0	4,6	809	470	11,5	1,7	4,9

Tab. IV. Kombinierte Fettbelastung bei Ratten, die mit Diät I (Protein-Cholesterin-reich) vorbehandelt wurden. Versuch c *ohne Cholesterinvorfütterung*. Chronische Zulage von 10% Schweineschmalz zum Futter, akute Sondenfütterung mit Maisöl, 3 cm³/kg Tiergewicht. Gesamtfett, Gesamtfettsäuren und Cholesterin in mg% (Cholesterin: Gesamt/frei). 2–4fach ungesättigte Polyenfettsäuren in % des Gesamtfettes. Werte jeweils vor und 120 min nach Maisölgabe.

Zeit		Kontrolle (Diät I)						10% Schweineschmalz (im Normalfutter)					
		Gesamtfett mg%	Fettsäuren mg%	Cholesterin mg%	Polyenfettsäuren in % 2fach	3fach	4fach	Gesamtfett mg%	Fettsäuren mg%	Cholesterin mg%	Polyenfettsäuren in % 2fach	3fach	4fach
Ausgangswert	a	1543	613	—	5,6	1,0	1,9						
vor Belastung	b	1823	627	149/236	3,6	1,3	1,7						
	c	631	185	77/37	4,0	2,0	8,8						
Ausgangswert	a	2236	869	—	6,1	1,1	1,7						
nach Belastung	b	2323	741	159/195	3,5	0,9	1,3						
(Maisöl)	c	723	285	45/36	6,6	2,5	4,7						
Nach 20 Tagen	a	488	185	—	7,8	1,9	4,7	453	171	—	5,4	1,4	3,7
vor Belastung	b	418	210	57/20	3,8	2,1	4,8	565	299	23/60	7,1	2,5	4,3
	c	370	171	31/16	7,4	3,4	6,3	363	157	19/36	2,9	1,9	3,9
Nach 20 Tagen	a	535	288	—	9,7	2,1	5,4	674	285	—	8,0	1,6	4,3
nach Belastung	b	483	213	65/22	5,0	1,9	5,6	620	305	25/74	4,4	2,3	3,3
(Maisöl)	c	498	242	35/19	6,2	2,2	5,8	600	299	17/32	3,2	1,7	4,4

In Tabelle V sind schliesslich 2 Versuche mit Rattenkollektiven dargestellt, die 4 Wochen mit Diät II (Protein-arm, Kohlenhydrat- und Cholesterin-reich) vorbehandelt wurden. Das Gesamtbild entspricht dem zu Tabelle IV gegebenen Kommentar, nur liegen die Werte für die Gesamtfette noch höher, es kommt zu einem ausgesprochen starren Verhalten der Linolsäure und niedrigen Werten für die Arachidonsäure. Nach 20 Tagen ist die Hyperlipidämie ebenfalls verschwunden, das Verhalten der Linolsäure beginnt sich zu normalisieren, die Arachidonsäure zeigt (mit einer Ausnahme) den normalen typischen Abfall nach der Maisölbelastung.

Zu den histologischen Befunden möchten wir in der vorliegenden Arbeit nicht näher Stellung nehmen, möchten nur auf die sehr auffällige Diskrepanz hinweisen, die in dem Vorkommen eindeutiger Veränderungen im Lipoidhaushalt, beurteilt nach den Serumbefunden einerseits und dem Fehlen von Lipoidablagerung und Cholesterinvermehrung in der Gefässwand andrerseits, bei der Mediasklerose besteht. Auch die Frage nach der Reversibilität experimenteller Gefässwandschäden nach atherogener Kost lässt sich noch nicht zuverlässig beantworten.

Schlussfolgerungen

Unsere Versuche an mit Fett überfütterten Ratten, die zusätzlich einer akuten Maisöl- bzw. Olivenölbelastung unterworfen wurden, lassen hinsichtlich des Verhaltens der Gesamtlipoide sowie der Polyenfettsäuren im Blut folgende Schlüsse zu: Der gesunde Rattenorganismus ist fähig, auch über längere Zeit eine Zugabe von 10% Fett mit vorwiegend gesättigten Fettsäuren (Schweineschmalz, Rahm) in der Kost zu bewältigen, ohne dass Zeichen einer Fettstauung, einer Ketose oder einer sonstigen Fettumsatzstörung nachweisbar wären. Wird das gesättigte Fett durch Leinöl mit hohem Linolsäuregehalt ersetzt, so lässt sich eine Beschleunigung der Fettverwertung an einer Verminderung des Gesamtfettgehaltes und einem geringeren Anstieg nach akuter zusätzlicher Fettbelastung erkennen. Für die Polyenfettsäuren ist eine regelmässige Verschiebung des Sättigungsgrades nach Mais- bzw. Olivenöl charakteristisch, die in einer Steigerung der Linolsäure- bei gleichzeitiger Verminderung der Arachidonsäurewerte besteht. Solange wir keine exakten Kenntnisse über die physiologische Bedeutung von Sättigung und Entsättigung der Fettsäuren im intermediären Stoffwechsel besitzen, sind wir wohl nur berechtigt, eine wesentliche Funktion der Polyensäuren in der raschen Umsetzungsgeschwindigkeit zu sehen, die ganz allgemein Verbindungen mit reaktionsfähigen Doppelbindungen im Stoffumsatz zukommt. Dies hat für den Fettsäuretransport, die akute Bereitstellung von Brennmaterial sowie für die Bindungsgeschwindigkeiten an Lipoide, Phosphatide oder Glyceride bestimmt eine sehr wesentliche Bedeutung. Ob man jedoch berechtigt ist, Veränderungen des quantitativen Verhältnisses von gesättigten zu ungesättigten Fettsäuren mit der Entstehung und dem chronischen Ablauf des Atheromatoseprozesses in aetiologischen Zusammenhang zu bringen, ist eine ganz andere Frage.

In der Literatur sind hierfür äusserst divergente Tatsachen und Meinungen zu finden. Unumstritten bei allen Forschern ist nur die Tatsache, dass die Linolsäure die quantitativ wichtigste 2fach ungesättigte physiologische Fettsäure ist, die sich sowohl im Blut als auch in den verschiedensten Organen, in Haut (BERNHARD[12]) und Carcass (WAGNER[13]) neben anderen mehrfach ungesättigten Fettsäuren findet. In den atheromatösen Plaques der grossen Körpergefässe werden ungesättigte Fettsäuren ebenfalls gefunden. Bei Hühnern nimmt ihr prozentualer Anteil proportional mit der Schwere des Atheromatosebefalls nach FISHER und FEIGENBAUM[14] zwar ab, die Ernährung mit Linolsäure-reichem Maisöl über längere Zeit verhütet aber die Plaquebildung in keiner Weise. Von den Untersuchungen an menschlichem Material erscheinen die Arbeiten von BÖTTCHER et al.[15] über die Fettsäureverteilung in den Lipoiden der menschlichen Aortenwand von besonderem Interesse. Hiernach steigt der Gehalt an Polyenen in der Cholesterinester-Fraktion mit zunehmender Atherosklerose an unter gleichzeitiger Abnahme der Cholesterinester gesättigter Fettsäuren. Die gleichen Autoren haben in einer Publikation allerjüngsten Datums[16] über ihre Befunde in anderen Gefässgebieten berichtet. Danach zeigt die Lipoid- und Fettsäurezusammensetzung der Intima und Media von Coronar- und Hirn-

[12] K. BERNHARD, F. WYLER, O. WAGNER und H. WAGNER, Schweiz. Med. Wschr. *89*, 787 (1959).
[13] H. WAGNER, E. SEELIG und K. BERNHARD, Schweiz. Med. Wschr. *87*, 1423 (1957).
[14] H. FISHER und A. S. FEIGENBAUM, Nature *186*, 85 (1960).
[15] C. J. F. BÖTTCHER, F. P. WOODFORD, C. CH. TER HAAR ROMENY-WACHTER, E. BOELSMA-VAN HOUTE und C. M. VAN GENT, Lancet I *1960*, 1378.
[16] C. J. F. BÖTTCHER, E. BOELSMA-VAN HOUTE, C. CH. TER HAAR ROMENY-WACHTER, F. P. WOODFORD und C. M. VAN GENT, Lancet II *1960*, 1162.

Tab. V. Kombinierte Fettbelastung bei Ratten, die mit Diät II (Protein-arm, Stärke-Cholesterin-reich) vorbehandelt wurden. Akute Sondenfütterung mit Maisöl, 3cm³/kg Tiergewicht. Gesamtfett und Gesamtfettsäuren in mg%, 2–4fach ungesättigte Polyenfettsäuren in % des Gesamtfettes. Werte jeweils vor und 120 min nach Maisölgabe. Cholesterin in mg%. Gesamt/frei.

Zeit	Kontrolle (Diät II)						10% Schweineschmalz (im Normalfutter)					
	Gesamtfett mg%	Fettsäuren mg%	Cholesterin mg%	Polyenfettsäuren in % 2fach	3fach	4fach	Gesamtfett mg%	Fettsäuren mg%	Cholesterin mg%	Polyenfettsäuren in % 2fach	3fach	4fach
Ausgangswert	2452	940	203/176	5,4	1,2	1,3						
vor Belastung	4024	1425	—	5,7	0,8	3,3						
Ausgangswert *nach*	2705	1040	207/165	6,6	1,3	1,7						
Belastung (Maisöl)	2880	—	—	6,0	1,0	1,7						
Nach 20 Tagen	367	171	64/30	3,5	2,6	5,2	463	242	30/58	6,8	3,7	5,1
vor Belastung	488	185	—	5,9	2,0	4,5	500	171	—	6,8	2,0	5,3
Nach 20 Tagen *nach*	581	257	67/31	3,9	2,6	4,0	593	299	30/58	7,8	2,2	4,6
Belastung (Maisöl)	701	299	—	8,3	1,8	4,5	666	356	—	10,5	1,7	4,8

gefässen (*Circulus arteriosus* Willisii) wohl die gleiche Tendenz der Veränderungen mit zunehmender Atheromatose wie bei der Aorta, es kommen jedoch teilweise sehr grosse quantitative Unterschiede und bezüglich einzelner Komponenten sogar gegensinnige Verschiebungen zur Beobachtung. Offenbar spielen also lokale Verschiedenheiten einzelner Gefässgebiete bei der Atheromatoseentstehung eine sehr wichtige Rolle.

Ebenso uneinheitlich wie beim atheromatösen Gefäss sind die Literaturbefunde über Bestimmungen der Blutlipoide. SCHETTLER[17] findet eine signifikante Serumlipoid-senkende Wirkung langfristiger Leinölgaben im Vergleich zu Butter oder Cocosfett beim Menschen, lehnt aber einen pathogenetischen Zusammenhang von Linolsäuremangel für die Entstehung der menschlichen Atheromatose ab. Nach GLATZEL[18] ist ein Zusammenhang von Fettkost und Atheromatose bzw. Herzinfarkt sehr zweifelhaft, Cholesterinfütterungsversuche am Tier werden von ihm als gänzlich irreleitend verworfen. ANTONIS et al.[19] finden im Serum von Europäern im Vergleich zu Bantunegern, deren Nahrung sehr fettarm und relativ Linolsäure-reich ist und bei denen atherosklerotische Veränderungen selten gefunden werden, in allen Altersstufen niedrige Triglyceride und hohe Dien- sowie Tetraenwerte im Blut. Im Vergleich hierzu gehen beim Europäer mit der bekannten gemischten Kost und häufiger Atherosklerose mit fortschreitendem Alter eine ständige Zunahme von Triglyceriden einer Abnahme von Dienen und Tetraenen parallel. Zu einem gleichen Resultat sind PATIL et al.[20] bei ihren Studien an Indern gelangt. In sehr systematischen Untersuchungen haben sich SCHRADE und sein Arbeitskreis[21] mit der Analyse der Blutlipoide des Menschen befasst; wir kommen auf diese Arbeiten unten noch zurück.

Die Liste der Publikationen, die *pro* oder *contra* einen pathogenetischen Zusammenhang zwischen Atheromatose und Gehalt der Nahrung an ungesättigten Fettsäuren bzw. ihrem Vorkommen in Blut und Geweben sprechen, liesse sich unschwer beliebig verlängern. Wir möchten an dieser Stelle nur festhalten, dass jede Übereinstimmung der Ansichten fehlt und dass sich rein theoretisch je nach Auswahl der Literatur ein ganz verschiedenartiger Standpunkt ableiten liesse.

In unseren Versuchen zu diesem Problem haben wir bei Ratten, die durch eine viel Cholesterin enthaltende, Protein- oder Kohlenhydrat-reiche Diät bzw. durch Calciferol-Parathormon vorbehandelt wurden, typische Veränderungen im Gesamtlipoidgehalt bzw. im relativen Polyensäureanteil beobachtet. Bei hochgradiger Hyperlipidämie infolge Diätvorbehandlung zeigt der relative Anteil an Linolsäure keine entsprechende Steigerung, die Anstiege nach akuter Maisölbelastung fallen kleiner aus als bei Normaltieren, die Verschiebung im Sättigungsgrad unter den Polyensäuren haben anderen Charakter, indem zum Beispiel die Arachidonsäure nach einem 20tägigen Intervall ungewöhnlich hoch liegt und nach Belastung sogar noch zunimmt. Eine Rückbildung der Stoffwechselverhältnisse zur Norm erfolgt in der von uns verfolgten Zeitspanne von 20 (40) Tagen nicht, und zwar weder in der *ohne* noch in der mit zusätzlicher Fettzulage überfütterten Gruppe.

Auch bei Calciferol-behandelten Tieren, bei denen sich eine Mediasklerose entwickelt, treten auffällige Veränderungen im Fettstoffwechsel auf: Die anfängliche Steigerung der Gesamtfette erstreckt sich auch auf die Polyenfettsäuren Linol- und Arachidonsäure. Die Reaktion auf die Maisölbelastung ist träge, nach Ablauf von 20 Tagen sind meist wieder normale Verhältnisse eingetreten. Gelegentlich kann es zu vollständigem Zusammenbruch der intermediären Fettumsetzung mit progressiver Hyperlipidämie und hochgradigem relativem Polyensäuremangel kommen. Die beiden von uns untersuchten Formen von Gefässwandschädigungen bieten also hinsichtlich ihres Stoffwechsels ein eindeutig verschiedenes Bild.

Zieht man, im Bestreben, auf mögliche Analogien der Verhältnisse bei der tierexperimentellen und menschlichen Atheromatose zu schliessen, die sehr ausgedehnten Untersuchungen von SCHRADE et al.[21] heran, so kann man feststellen, dass auch beim Menschen mit manifester Atheromatose ein relatives Absinken der Linolsäure (als der quantitativ wichtigsten Polyensäure) nachweisbar ist. Diese Autoren haben charakteristische Unterschiede der relativen Fettsäureanteile in den 4 Lipidfraktionen – Cholesterin, Phosphatide, Glyceride und freie unveresterte Fettsäuren – nachgewiesen und, was hier besonders interessiert, bei Arteriosklerotikern und Diabetikern mit Hyperlipidämie eine regelmässige absolute Verminderung der ungesättigten Fettsäuren speziell im Cholesterinester-, aber auch im Phosphatidanteil gefunden. In ihren ersten Arbeiten sind SCHRADE et al. methodisch gleich vorgegangen wie wir, in ihren letzten Publikationen haben sie sich der Gaschromatographie bedient und damit die genaue Verteilung der Polyensäuren auf die einzelnen Lipoidbestandteile sowie die quantitativen Verhältnisse für alle im menschlichen Blut vorhandenen Fettsäuren differenziert. Sie betonen ausdrücklich hinsichtlich der Gesamtlipoid- und Polyenfettsäurebestimmung die völlige Übereinstimmung ihrer jetzigen gaschromatographischen Befunde mit ihren früheren spektrophotometrisch gewonnenen. – Es sei hier nur erwähnt, dass auch die SCHRADEschen Ergebnisse nicht unbestritten geblieben sind, und dass zum Beispiel von KAUFMANN und SCHMIDT[22] eine Polyenfettsäureverminderung im Serum bei den von ihnen untersuchten Arteriosklerotikern nicht gefunden wurde.

In der Frage, ob die bis heute vorliegenden experimentellen Befunde bei Tier und Mensch schon dazu berechtigen, Konsequenzen für die Einbeziehung der ungesättigten Fettsäuren in die Prophylaxe und Therapie der menschlichen Atheromatose zu ziehen, möchten wir zu grosser Zurückhaltung raten. Wohl sind genügend Belege für die Beeinflussung des Cholesteringehaltes im Blut durch Zugabe ungesättigter Fettsäuren beigebracht worden. Die bekannten *in vitro*-Versuche von RUTSTEIN et al.[23] an überlebenden menschlichen Aortenfibroblasten, die in der Zellkultur Cholesterin aufnehmen bzw. abgeben, je nach Zusatz von gesättigten oder ungesättigten Fettsäuren zum Nährmedium, sind der sinnfälligste experimentelle Beweis für solche Beziehungen. Atheromatose ist aber, wie schon oben betont, nicht reine Folge oder Begleiterscheinung der Hypercholesterinämie und bei der Vielfalt der Entstehungsfaktoren für degenerative Gefäss-

[17] G. SCHETTLER, Bull. Schweiz. Akad. Med. Wissensch. *13*, 301 (1957). – G. SCHETTLER und M. EGGSTEIN, Klin. Wschr. *37*, 485 (1959).

[18] H. GLATZEL, Dtsch. med. Wschr. *85*, 1296 (1960).

[19] A. ANTONIS und I. BERSOHN, Lancet I *1960*, 998.

[20] V. S. PATIL und N. G. MAGAR, Biochem. J. *76*, 417 (1960).

[21] W. SCHRADE, R. BIEGLER und C. OH, Klin. Wschr. *34*, 1242 (1956). – W. SCHRADE, E. BÖHLE und R. BIEGLER, Klin. Wschr. *37*, 1101 (1959). – W. SCHRADE, E. BÖHLE, R. BIEGLER, V. MEDER und R. TEICKE, Klin. Wschr. *38*, 126, 707 (1960). – W. SCHRADE, E. BÖHLE, R. BIEGLER, R. TEICKE und B. ULLRICH, Klin. Wschr. *38*, 739 (1960). – W. SCHRADE, E. BÖHLE und R. BIEGLER, Lancet II *1960*, 1409.

[22] H. P. KAUFMANN und G. SCHMIDT, Fette, Seifen, Anstrichmittel *62*, 399 (1960).

[23] D. D. RUTSTEIN, E. FASOLINO INGENTIO, J. M. CRAIG und M. MARTINELLI, Lancet I *1958*, 545.

wandveränderungen kann mit einer Senkung des Cholesterinspiegels allein das Problem niemals gelöst werden. Es scheint uns aber unter Berücksichtigung der bereits vorliegenden Literatur und unserer eigenen Befunde unbestreitbar, dass die Erforschung des Verhaltens von ungesättigten Fettsäuren in ihren gegenseitigen qualitativen und quantitativen Beziehungen und in ihrer Verteilung auf die verschiedenen Lipoidfraktionen unter den Bedingungen des Tierexperiments sowie beim Menschen sinnvoll und notwendig ist, käme doch der Aufklärung der Rolle der ungesättigten Fettsäuren für Biochemie, Physiologie und Pathologie des Gesamtstoffwechsels grösste Bedeutung zu.

Summary. The influence of chronic overfeeding of rats with saturated (lard, cream) and unsaturated (linseed oil) fats was studied by estimating total lipids and polyunsaturated fatty acids in the serum. Preliminary assays had shown that the determination of β-ketoacids, pyruvic acid and blood sugar gave no useful information on the regulation of the intermediate fat metabolism. Using an additional acute loading with corn oil, and comparing the blood fat values before and after this procedure, the following results were obtained:

Normal rats showed no changes of the values for total lipids after chronic overfeeding with saturated fat in comparison with the untreated controls. After linseed oil the lipid level is significantly lower and the rise after acute corn oil-feeding becomes smaller, most probably as a sign of an acceleration of the fat metabolism. Characteristic changes were seen by examining the 2 and 4 times unsaturated linoleic and arachidonic acids. Whilst linoleic acid shows a rise after feeding both saturated and unsaturated fat, still increasing after corn oil, arachidonic acid remains nearly unchanged by chronic fat-feeding but falls regularly after acute corn oil loading. Here we have a typical alteration of the saturation degree of polyunsaturated fatty acids after longer periods of overfeeding with fats.

If we produced a sclerosis of the media of the aortic wall in rats by treating them with calciferol-parathormone, we observed a strong hyperlipemia which became still more pronounced after corn oil. The values for linoleic acid were also high but did not rise after corn il; the behaviour of arachidonic acid was not uniform. 20 days later the untreated controls, as well as the lard-fed animals, showed normal data. By pretreating the rats with a diet rich in cholesterol and protein (diet I), or rich in cholesterol and carbohydrate but poor in protein (diet II), atherosclerosis-like changes developed. In the serum of these animals, the lipids were still more accumulated and were highest after acute corn oil loading. The values for linoleic acid were scarcely altered by corn oil; the arachidonic acid was low after diet I and II and increased after 20 days to an unusually high level. Total lipid values and the reaction to lard feeding were normalized after 20 days.

Our findings are discussed and compared with some facts to be found in the literature. Even if the importance of polyunsaturated fatty acids for human atherosclerosis is not yet to be judged, further investigation in this field seems highly justified, considering the complete lack of exact knowledge of the functional significance of these substances for basic metabolic processes under physiological and pathological conditions.

S. MARKEES

Medizinische Poliklinik Basel, 27. März 1961.

STUDIORUM PROGRESSUS

The Adrenal Cycle in Men on Different Schedules of Motor and Mental Activity[1]

The circadian[2–5] cycle of the mammalian adrenal cortex, an endocrine entity intimately related to over-all motor and mental activity[6,7], is not a direct or immediate 'response' to the activities of everyday life. First, the rhythm of blood eosinophils, admittedly an indirect index, persists in men active more or less continuously for two consecutive days in the absence of overt sleep, on a demanding schedule of sampling and laboratory work, carried out with rest periods of only short duration for eating and other essential needs[6]. Second, the onsets of the circadian periodic decrease in blood eosinophils[8] and of the rise in the corticosterone content of mouse serum[9,10], which are preparatory to activity[7], usually lead-in-phase the major daily bursts in gross motor behavior. Apart from the direct and well-known adrenal cortical 'reactions' to environmental stimuli eliciting activity, the spontaneous physiologic activation of this gland seems to occur during sleep or rest[9]. Other aspects of the relation between circadian periodic body activity and the adrenal cortical cycle, such as phase-shifts and phase-drifts, also have been explored, at least in the mouse[9,11,12], by eosinophil counts, and, more recently and more directly, by hormone determinations in the blood[9,10] and the adrenal gland itself[13] of the same species.

In the mouse, hormone rhythms, among others, can be studied by serially independent sampling[14] in the absence of effects from sampling as such, which in itself is a powerful environmental stimulus. Through the use, at consecutive time points, of separate groups of animals that are comparable in terms of strain, sex, age, and history, highly significant sampling effects[15] can be controlled in this species.

[1] Supported by grants from the Teagle Foundation, through Dr. M. COHEN, the U.S. Public Health Service (No. C-4359(C1), No. 1A-1573(C3), No. H-1983(C3), the American Cancer Society (No. E-155B), and the Minnesota State Department of Public Welfare.

[2] Circadian is derived from *circa* = about and *dies* = day.

[3] C. S. PITTENDRIGH, Cold Spring Harbor Symposium on Quantitative Biology *25*, 159 (1960).

[4] F. HALBERG, Z. Vitamin- Hormon- Fermentforsch. *10*, 225 (1959).

[5] F. HALBERG, Perspectives in Biology and Medicine *3*, 491 (1960).

[6] F. HALBERG, M. B. VISSCHER, E. B. FLINK, K. BERGE, and F. BOCK, Lancet *71*, 312 (1951).

[7] F. HALBERG, Lancet *73*, 20 (1953).

[8] F. HALBERG, R. ENGEL, E. A. TRELOAR, and R. J. GULLY, Arch. Neurol. Psych. *69*, 462 (1953).

[9] F. HALBERG, E. HALBERG, C. P. BARNUM, and J. J. BITTNER, *Photoperiodism and Related Phenomena in Plants and Animals* (R. B. WITHROW, Ed. Publ. No. 55 of the Amer. Assoc. Adv. Sci., Washington D.C. 1959), p. 803.

[10] F. HALBERG, R. E. PETERSON, and R. H. SILBER, Endocrinology *64*, 222 (1959).

[11] F. HALBERG, M. B. VISSCHER, and J. J. BITTNER, Amer. J. Physiol. *174*, 313 (1953).

[12] F. HALBERG, M. B. VISSCHER, and J. J. BITTNER, Amer. J. Physiol. *179*, 229 (1954).

[13] F. HALBERG, P. G. ALBRECHT, and J. J. BITTNER, Amer. J. Physiol. *197*, 1083 (1959).

[14] F. HALBERG and M. B. VISSCHER, Proc. Soc. exp. Biol. Med. *75*, 846 (1950).

[15] F. HALBERG, Proc. Soc. exp. Biol. Med. *82*, 160 (1953).

The question of sampling effects, however, is more difficult to handle in human beings studied by conventional venipuncture although the rhythm of cortical adrenal hormones in human urine[16] and blood[17–19] is well-established. Data on the plasma 17-hydroxycorticosteroid rhythm of men not awakened by venipuncture then are of interest, particularly if sleep can be verified by electroencephalograms recorded during blood withdrawal. In results thus obtained, sampling effects probably are minimized. One might thus explore the question whether, as has been postulated[7], the major endogenous adrenal cortical activation occurs during actual sleep. The possibility that awakening, as such, may result in the circadian rise of plasma 17-hydroxycorticosteroid could thus be ruled out.

Data pertinent to these problems recently became available from work on the relation of the adrenal cycle to circadian changes in the electroencephalogram, recorded with concomitant frequency analysis (to be reported elsewhere[20]). Two groups of subjects were involved. One of these, Group I, was composed of 13 normal mature males, 22 to 35 years of age. These individuals rested during the night. By day, they followed their habitual activities as medical school staff. From some of the Group I subjects the sample of blood was withdrawn through an indwelling venous catheter without disturbance of sleep and this was verified electroencephalographically as well as behaviorally. In other Group I subjects, despite the catheter, sampling was associated with drowsiness or awakening.

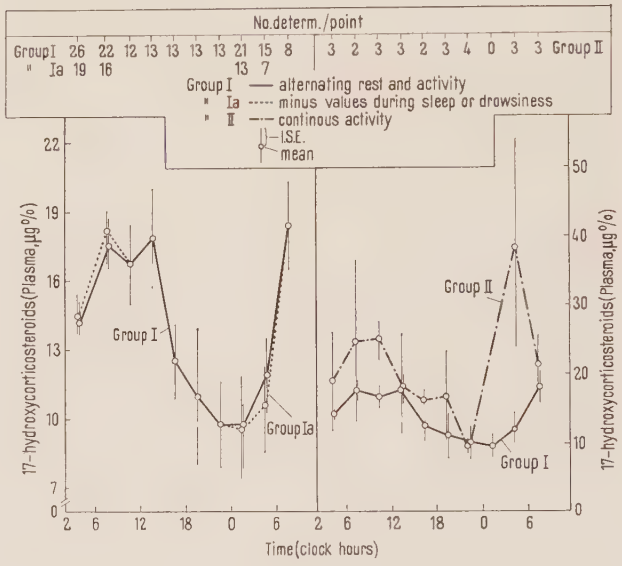
Group II consisted of three of the experimenters, who also carried venous catheters. These subjects had followed their regular hospital staff activities during the day preceding the start of sampling and they did not go to bed during the entire period of the study. Group II subjects were engaged, moreover, in almost continuous mental, if not gross motor, activity. They sat down only for short periods, that did not exceed 30 min and were spread irregularly over the day and the night. The activities of Group II subjects included the withdrawal of samples, around the clock, from the Group I subjects and from each other, the operation of the electroencephalograph, of the frequency analyzer and other aspects of experimental work (e.g. preparation of test tubes, labeling of samples, recording of data).

The Figure, left, shows the significant circadian periodic change in plasma 17-hydroxycorticosteroids of Group I subjects, active by day but resting by night. For the hours of rest two curves are shown, one including the values obtained during sleep or drowsiness (Group I curve), the other excluding the latter values (Group Ia curve). The curves are similar.

Sampling was not frequent enough to examine short-term changes, e.g. possible 90-min cycles in plasma 17-hydroxycorticosteroid behavior of sleeping men[21]. But despite the considerable scatter of individual values, in the presence as well as absence of electroencephalographically ascertained sleep, the nocturnal rise of plasma 17-hydroxycorticosteroids stands out clearly in these subjects habitually active by day and resting by night while they adhered to the same rest and activity schedule during the experimental period – some of them without interruption of sleep. Some of the individual sleep values were much higher than the group mean for the corresponding period.

Group II behavior is compared to that of Group I in the right half of the Figure. First of all, the adrenal hormone rhythm in plasma persists in the experimenters, Group II, who were more or less continuously active for two 24 h periods. The cyclic changes in Group II (as compared to Group I) are apparently characterized by (1) a higher over-all level, by (2) a greater peak-to-trough difference and by (3) a shortening of the interval between consecutive peaks, suggesting an acceleration of the adrenal cycle.

The Group II curve is based upon a limited number (26) of determinations (see right top of Figure). The curve serving (as the standard of reference) for comparison with Group II, however, comprises 156 determinations (for number of determinations see Group I, left top of Figure). The total of 172 determinations may suffice to support the foregoing interpretation; the latter must be qualified, however, as being applicable only to the type of 'continuous' activity involved in this study and to the particular stage of adrenal cycle in which novel activities were begun, i.e. the early ascending stage of the circadian plasma 17-hydroxycorticosteroid rhythm. Seasonal effects and other intercurrent (e.g. metereologic) sources of variation are unevaluated herein. Moreover, the transverse profiles[22] of this study involve determinations on several subjects for relatively short periods, yet they should approximate the behavior of such a group over many cycle lengths. The significance of such transverse profiles depends upon replications on other occasions. From this viewpoint the current study may, perhaps, be regarded as


No.determ./point
Group I 26 22 12 13 13 13 13 21 15 8 | 3 2 3 3 2 3 4 0 3 3 Group II
" Ia 19 16 13 7
Group I — alternating rest and activity
" Ia ----- minus values during sleep or drowsiness
" II —·— continous activity
I S.E.
mean
17-hydroxycorticosteroids (Plasma, µg %)
Group I
Group Ia
Group II
Group I
Time (clock hours)

Time-course of adrenal cycle in normal mature human males. Group I subjects, on a schedule of diurnal activity and nocturnal rest and sleep (N = 13). Group II subjects active by day and by night, without sleep (N = 3). Group I curve is the same in both halves of Figure; ordinates show different scales for the plasma 17-hydroxycorticoid value.

[16] G. Pincus, J. clin. Endocrinol. *3*, 195 (1943).
[17] W. Appel and K. J. Hansen, Deut. Arch. klin. Med. *199*, 530 (1952).
[18] E. L. Bliss, A. A. Sandberg, D. H. Nelson, and K. Eik-Nes, J. clin. Invest. *32*, 818 (1953).
[19] R. P. Doe, E. B. Flink, and M. G. Goodsell, J. clin. Endocrinol. Metab. *16*, 196 (1956).
[20] G. Frank et al., to be published. Plasma 17-hydroxycorticosteroids were determined by the method of C. Wu and H. L. Mason, Proc. Staff Meet. Mayo Clinic *33*, 627 (1958).
[21] A. Shapiro, Cold Spring Harbor Symposium on Quantitative Biology *25*, 309 (1960).
[22] F. Halberg, Cold Spring Harbor Symposium on Quantitative Biology *25*, 289 (1960).

a replication of the blood eosinophil profiles of normal men on different schedules of activity, studied earlier[6] with similar results.

Conclusions. The adrenal cortical cycle evaluated by plasma 17-hydroxycorticosteroid levels persists in healthy mature men sleeping undisturbed, while their blood is withdrawn through indwelling venous catheters. This cycle persists also in subjects continuously active for two days, mentally as well as physically. Moreover and at least for two days, continuous 'overall' activity in man actually enhances, rather than obliterates, the adrenal cortical cycle. More specifically, motor or mental activity continued for 48 h raises the peak-to-trough difference of the plasma 17-hydroxycorticosteroid rhythm, with an associated increase in overall hormone level, while the cycle's length shortens during the 24 h period following a first wakeful night.

These findings are viewed in the context of earlier work, showing (1) the persistence of the adrenal cycle evaluated by serially independent sampling on the mouse, in the absence of intentional stimulation[14], even in constant darkness[11], and (2) the persistence of a predominating circadian period (rather than primary 12 h period) in the eosinophil rhythm of human beings subjected to a drastic 12 h stressor schedule[9,22,23] until 'regressed' and disoriented in time.

In mice and man, the adrenal cycle thus constitutes an endocrine entity in its own right and it is not simply 'persisting from within while impressed from without'; its circadian periodic behavior, an aspect of functional integration[5,22], underlies our adaptation to changes in schedules[24]. Information on the adrenal cycle is of practical interest in dealing with many facets of temporal coordination in human physiology, ranging from the scheduling of activities on earth to the planning of routines for life in aerospace[25].

Zusammenfassung. Der venöse Plasmaspiegel von 17-Hydroxycorticosteroiden, als Mass der Nebennierenrindenaktivität verwendet, wurde bei gesunden jungen Männern mit Hilfe von Verweilkathetern in regelmässigen Abständen bestimmt. Die Corticoidsekretion steigt und fällt circadisch-periodisch. Auch bei (durch EEG) kontrolliertem ungestörtem Schlaf oder bei über 48 h anhaltender körperlicher und geistiger Arbeit wird der Sekretionsrhythmus nicht gestört, durch die Daueraktivität sogar verstärkt. Der circade Sekretionsrhythmus ist also weitgehend unabhängig vom Aktivitätsgrad des Organismus.

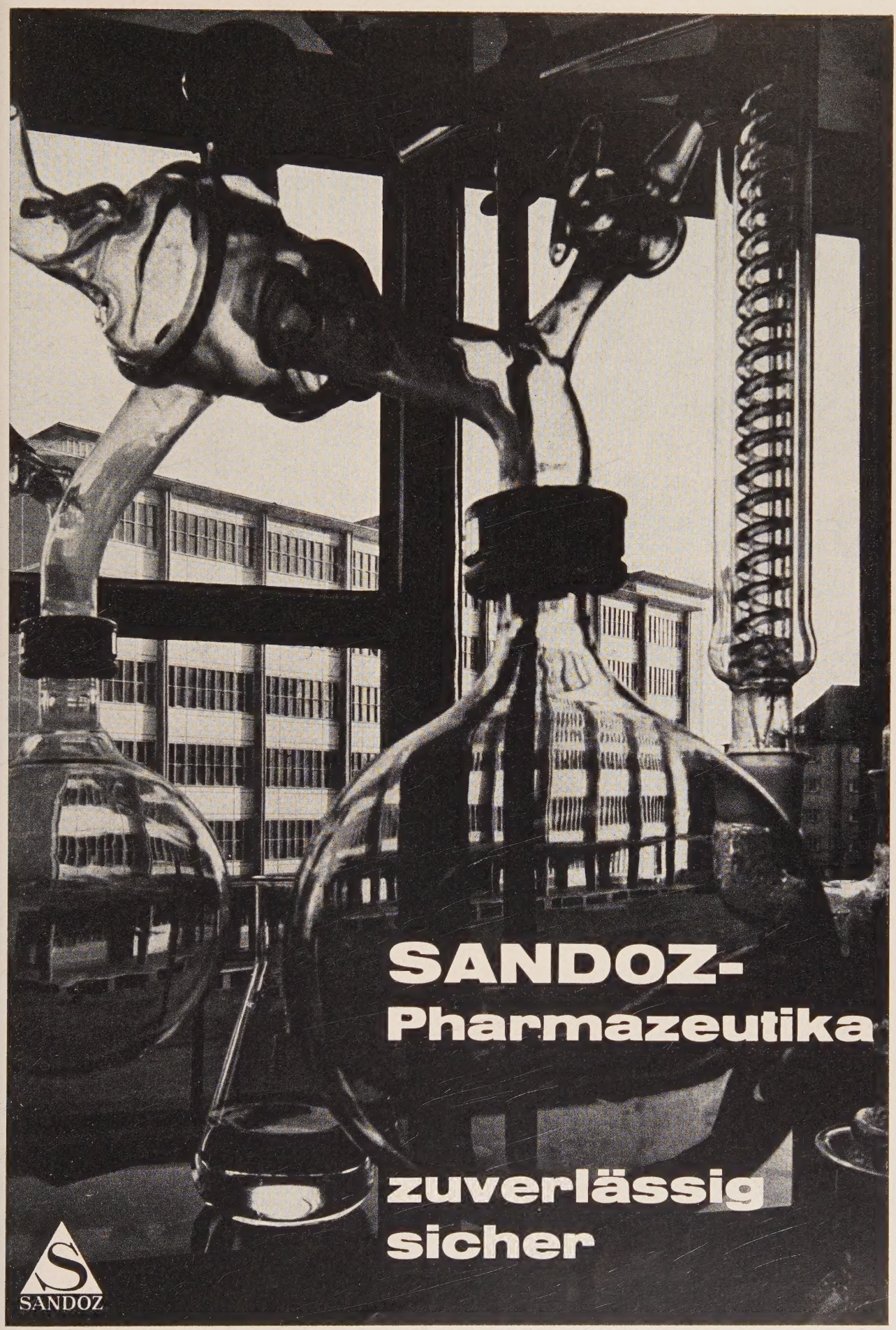
F. Halberg, G. Frank, R. Harner, J. Matthews, Harriet Aaker, H. Gravem, and J. Melby

Medical Schools, University of Minnesota, Stanford University, and University of Arkansas (USA), February 20, 1961.

[23] W. Fleeson, B. C. Glueck, and F. Halberg, The Physiologist *1*, 86 (1957).

[24] E. B. Flink and R. P. Doe, Proc. Soc. exp. Biol. Med. *100*, 498 (1959).

[25] F. Halberg, in: *Psychophysiological Aspects of Space Flight* (Ed. Flaherty, Columbia University Press 1961), p. 166.


SANDOZ-
Pharmazeutika
zuverlässig
sicher
SANDOZ

DIE UMSCHAU

in Wissenschaft und Technik

berichtet aktuell und objektiv über alles, was auf den Gebieten der Naturwissenschaft, der Medizin und der Technik an neuen Erkenntnissen von allgemeinem Interesse ist. Damit ist schon gesagt, dass sich diese Zeitschrift nicht nur an Akademiker wendet, sondern an alle aufgeschlossenen Menschen. Ja, gerade der Blick über die Grenzen des eigenen Arbeitsgebietes ist interessant und gibt jedem Leser eine umfassende geistige Sicherheit.

DIE UMSCHAU

in Wissenschaft und Technik

erscheint zweimal monatlich und kostet im Jahresabonnement je Heft DM 2.10, für Schüler und Studenten DM 1.65.

Ein kostenloses Probeheft liegt für Sie bereit. Bitte, beziehen sie sich auf diese Anzeige und schreiben Sie an den

UMSCHAU VERLAG

FRANKFURT AM MAIN

Stuttgarter Strasse 20–24

Kürzlich erschien:

Band 22, Heft 2, 1960

Schweizerische Zeitschrift für Hydrologie

Revue suisse d'Hydrologie

Hydrographie, Hydrobiologie, Fischereiwissenschaft, Abwasserreinigung / hydrographie, hydrobiologie, aquiculture, épuration des eaux polluées – Herausgegeben von der Hydrobiologischen Kommission der Schweizerischen Naturforschenden Gesellschaft – Erscheint seit 1920 – Redaktion: Professor Dr. O. Jaag, ETH, Zürich.

Jährlich erscheinen 2 Hefte mit zusammen 400 bis 500 Druckseiten. Abonnementspreis sFr. 32.– (DM 32.–), Einzelheft sFr. 17.– (DM 17.–). Die Bände 1–21 (1920–1959) sind alle noch vorrätig und kosten sFr. 32.– pro Band (die Bände 9, 10 und 17 können nicht einzeln abgegeben werden).

Aus dem Inhalt von Heft 2, Band 22, 1960:

H. Ambühl, Die Nährstoffzufuhr zum Hallwilersee. Chemische Untersuchungen an seinen Zuflüssen.

M. Auerbach/G. Rottengatter, Untersuchungen über den Wasseraustausch der einzelnen Becken des Untersees (II. Teil)

J.-P. Bargetzi, Application de méthodes d'analyse biochimique à un problème taxonomique: les Corégones du lac de Neuchâtel

G. H. Schwabe, Über den thermobionten Kosmopoliten *Mastigocladus laminosus* Cohn

W. Heinen, Biochemische und mikrobiologische Probleme der Stadtmüll-Kompostierung

Buchbesprechungen

Zu beziehen durch Ihre Buchhandlung

BIRKHÄUSER VERLAG
BASEL UND STUTTGART

Fortschritte der Arzneimittelforschung
Progress in Drug Research
Progrès des recherches pharmaceutiques

Editor: Dr. Ernst Jucker, Basel

Vol. 2 (1960), 636 pp., sFr. 85.- (DM 85.-)

Mit dem 1959 erschienenen ersten Band wurde eine Monographiereihe gegründet, die fortlaufend über aktuelle Gebiete der Arzneimittelforschung orientiert. Der nun vorliegende zweite Band enthält neun Übersichtsreferate bekannter Forscher, die ihre Themen erschöpfend behandeln und darüber hinaus noch Anregungen für die Bearbeitung und Weiterentwicklung verschiedener Forschungsgebiete vermitteln. Auch dieser Band schliesst eine Lücke in der Fachliteratur der Arzneimittelforschung, indem er einen Platz zwischen den bekannten Periodica und den grossen Handbüchern und Monographien einnimmt.

The first volume, which appeared in 1959, initiated a new and up-to-date series of progressive reviews covering topical subjects in pharmaceuticals research. The present, second volume contains nine reviews by well-known researchers who not only discuss their subjects in detail, but also make suggestions in which direction further work in various research subjects should develop. This volume also fills a gap in the technical literature dealing with pharmaceutical research; its place is between the known periodicals and the comprehensive text books and monographs.

En 1959 a paru le premier volume d'une série de monographies, visant à apporter une information continue sur des domaines d'actualité des recherches pharmaceutiques. Le présent volume 2 se compose de neuf exposés émanant de savants connus, qui traitent leur sujet de manière approfondie et proposent en outre des suggestions pour l'étude ou la poursuite des recherches sur différents thèmes. Ce volume prend place entre les périodiques connus et les manuels et monographies et comble ainsi une lacune de la bibliographie dans le champ de la recherche pharmaceutique.

Inhalt / Contents / Sommaire Vol. 2 (1960)

K. H. Beyer and J. E. Baer, West Point: **Newer Diuretics** - B. Camerino and G. Sala, Milano: **Anabolic Steroids** - C. J. Cavallito and A. P. Gray, Decatur: **Chemical Nature and Pharmacological Actions of Quaternary Ammonium Salts** - A. Cerletti, Basel: **Über Vorkommen und Bedeutung der Indolstruktur in der Medizin und Biologie** - W. Kunz, Monheim: **Über neue Arzneimittel** - K. Nádor, Budapest: **Ganglienblocker** - A. Pletscher, K. F. Gey und P. Zeller, Basel: **Monoaminoxydasehemmer** - W. A. Sexton, Macclesfield, Cheshire: **The Structure and Biogenesis of Certain Antibiotics** - D. W. Woolley, New York: **Antimetabolites and their Revolution in Pharmacology**

Inhalt / Contents / Sommaire Vol. 1 (1959)

J. B. Büchi, Zürich: Die Ionenaustauscher und ihre Anwendung in der Pharmazie und Medizin. - K. K. Chen und T.-M. Lin, Indianapolis: Cholesterol and its Relation to Atherosclerosis. - H. A. Oelkers, Hamburg: Die Chemotherapie der Wurmkrankheiten. - J. Bally, Basel: Neuere Aspekte der chemischen Anthelminticaforschung. - H. Haas, H. Fink und G. Härtfelder, Ludwigshafen: Das Placeboproblem. - A. H. Beckett, London: Stereochemical Factors in Biological Activity. - W. Kunz, Monheim: Eine Übersicht der neueren Arzneimittel aus den letzten fünf Jahren.

Zu beziehen durch Ihre Buchhandlung – Obtainable from your bookseller – Commandes à votre libraire

BIRKHÄUSER VERLAG · BASEL UND STUTTGART

DAS THEMA UNSERER ZEIT...

WELTRAUMFAHRT UND RAKETENTECHNIK

eine Zeitschrift zum Thema unserer Zeit: Hochinteressante Fotos, fesselnde und zuverlässige Berichte über Satelliten, Raumsonden, Mondraketen, Raumfahrzeuge und sämtliche aktuellen astronautischen Fragen. **Weltraumfahrt und Raketentechnik** zeigt, was heute auf diesen Gebieten geschieht und gibt einen Blick in die Welt von morgen. Namhafte Wissenschaftler aus aller Welt gehören zu den ständigen Mitarbeitern dieser Zeitschrift.

Weltraumfahrt und Raketentechnik erscheint sechsmal jährlich und kostet im Jahresabonnement DM 16.20 oder als Einzelheft DM 2.80 jeweils zuzüglich Porto. Ein Probeheft liegt für Sie bereit. Bitte beziehen Sie sich auf diese Anzeige und schreiben Sie an den

UMSCHAU VERLAG
Frankfurt am Main
Stuttgarter Strasse 20–24

WE NEVER SAY "NO"

WE SHIP YOUR ORDER TODAY
(Air Mail or Parcel Post, as you wish)

18,000
CHEMICALS FOR IMMEDIATE DELIVERY FROM STOCK.
LARGEST VARIETY ANYWHERE

Ask for our new catalogue

BIOS *Laboratories, Inc.*
17 West 60th St., New York City 23, U.S.A.
Kabeladresse: BIOSLAB

NEUERSCHEINUNG

Proceedings of the International Symposium on Polarization Phenomena of Nucleons

Basel, July 4 – 8, 1960
Editors: Prof. Dr. P. HUBER and Dr. K. P. MEYER
436 pp. – Preis Fr./DM 65.– (1961)

HELVETICA PHYSICA ACTA SUPPLEMENTUM VI

Contents / Inhalt:

I. *Production of Sources and Targets of Polarized Nuclei*
II. *Generation of Polarized Nucleons and Deuterons by Reactions*
III. *Reactions and Scattering of Polarized Particles*
IV. *Theories Concerning Polarization Effects of Nucleons*

Zu beziehen durch Ihre Buchhandlung
Obtainable from your bookseller
Commandes à votre libraire

BIRKHÄUSER VERLAG
BASEL UND STUTTGART